
ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FERMENTATION DU CIDRE

PAR M. E. KAYSER.

Le cidre se recommande à l'attention par ses qualités alimentaires, ses propriétés hygiéniques et l'importance de sa production qui, sans égaler celle du vin, atteint, en moyenne, depuis dix ans, 15 à 20 millions d'hectolitres, dont le prix est d'environ 300 millions de francs.

Aussi les départements de la Normandie et de la Bretagne qui sont le centre de cette production sont-ils très préoccupés de l'améliorer. Sous l'impulsion des Sociétés d'agriculture, et de diverses associations telles que la Société centrale d'horticulture de la Seine-Inférieure, et l'Association pomologique de l'Ouest, on crée des vergers d'études, on cherche les variétés de pommes qui ont le plus de bouquet, la plus grande richesse saccharine, on étudie les procédés de fabrication en vue de donner au cidre les qualités nécessaires pour supporter le transport, et de lui ouvrir de nouveaux débouchés sur les marchés de l'intérieur et de l'étranger.

C'est dans le même but qu'a été organisée, en décembre 1888, une exposition nationale des cidres et poirés, faite sous le haut patronage du ministère de l'Agriculture. Le laboratoire de fermentations de l'Institut national agronomique, récemment créé,

ne pouvait rester étranger à ce mouvement; aussi a-t-il accepté avec plaisir la proposition qui lui a été faite par M. Risler, directeur de l'Institut agronomique, et par M. Caubert, membre du Conseil supérieur de l'agriculture, d'étudier les cidres primés à ce concours, au point de vue chimique et au point de vue de la nature de leurs ferments.

Grâce à l'amabilité de M. Mesnier, commissaire du concours, nous avons pu recueillir de nombreux échantillons de cidres primés auxquels nous avons joint des cidres d'autres provenances.

La première partie de notre tâche a été de les étudier au point de vue chimique et voici quels ont été nos résultats.

I

Tous ces cidres ont été analysés par les procédés ordinaires dont quelques-uns, il faut le dire, ne sauraient viser à une grande précision, mais qui, dans leur ensemble, étant surtout destinés à nous fournir des termes de comparaison, peuvent être considérés comme suffisants pour conduire à ce résultat.

Voici, du reste, brièvement résumées, les diverses méthodes dont je me suis servi :

L'alcool a été dosé par distillation, après saturation préalable du cidre par l'eau de baryte. Dans le liquide distillé on dosait l'alcool à l'aide du compte-gouttes de M. Duclaux.

Pour le sucre, on additionne 40^{cc} de liquide de 2^{cc} de sous-acétate de plomb; on amène à un volume déterminé, on agite, on filtre. On prend un volume quelconque du liquide filtré, on le fait bouillir pendant une minute avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique, et on le ramène à un volume tel qu'il y ait environ 1 % de sucre, qu'on dose par la liqueur de Fehling.

Le tannin a été dosé par la méthode Lœwenthal-Neubauer, à l'aide du permanganate de potasse, sur 50^{cc} de cidre, étendus à 200^{cc}. Il est clair, à priori, que ce procédé ne saurait être précis. Rien ne démontre que le tannin du commerce, de provenance inconnue, qui sert à titrer la dissolution d'hypermanganate, se laisse oxyder par lui de la même façon et dans la même proportion que le tannin du cidre. Rien ne dit, non plus, qu'il n'y ait pas dans le cidre d'autres matières attaquables par l'hypermanganate et qui sont comptées comme tannin. En moyenne les nombres fournis par cette méthode sont inférieurs à ceux que

l'on obtient par le procédé de M. A. Girard, reposant sur l'emploi des cordes de violon, et il n'y a même pas, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, proportionnalité entre les nombres fournis par les deux méthodes. Mais comme il s'agissait surtout ici de comparer entre eux divers cidres, j'ai cru devoir passer par-dessus cette imperfection.

La *glycérine* a été dosée par la méthode de M. Pasteur, c'est-à-dire en traitant par le mélange d'alcool et d'éther le résidu de la distillation de l'alcool saturé par la baryte, après évaporation à siccité.

Pour l'*acidité totale*, on saturait par de l'eau de chaux, titrée au moyen d'un papier de tournesol sensible, 10^{cc} de cidre puisés dans une portion de liquide débarrassée de son acide carbonique au moyen d'une insufflation d'air.

Les *acides volatils* ont été étudiés en quantité et en qualité, par la méthode de la distillation fractionnée de M. Duclaux. On opérait, en général, sur 165^{cc} de cidre qu'on distillait à 150^{cc}. On neutralisait par un volume connu d'eau de chaux, on évaporait à 80^{cc}, on ajoutait la quantité d'acide tartrique nécessaire pour précipiter la chaux et on ramenait à 110^{cc} le liquide surnageant, que l'on traitait par la distillation fractionnée.

Toutes les fois que le total des quantités d'eau de chaux nécessaire pour la saturation des diverses prises ne dépassait pas 10^{cc}, on s'est contenté de rechercher si les chiffres des diverses prises croissaient régulièrement, ce qui correspond à la présence d'acide acétique pur, ou s'il y avait d'abord décroissance puis croissance régulière, ce qui indique un mélange d'acides gras supérieurs que l'on a évalués grossièrement et comptés comme acide butyrique. Quand la méthode comportait plus de précision, à raison du volume d'eau de chaux nécessaire pour saturer les diverses prises, on a déterminé aussi exactement que possible, par la méthode indiquée par M. Duclaux dans son livre « le lait » la proportion d'acide acétique et d'acide butyrique par litre.

Pour déterminer l'*extrait*, on a évaporé à 100° dans l'étuve Gay-Lussac, 10^{cc} de cidre jusqu'à cessation de perte de poids. De cet extrait on a retranché les éléments déjà dosés, y compris la glycérine pour les cidres pour lesquels cette détermination a été faite, et le reste est compté dans le tableau qui suit comme matières extractives non dosées.

ANALYSE DES CIDRES PRIMÉS A L'EXPOSITION NATIONALE DES CIDRES ET POIRÉS EN 1888.

| A. CIDRES DE BRETAGNE | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------|----------|-------------------|--------|---------|------------|----------|----------------------------------|-----------------|---------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| N ^o . | Années. | Densité. | Alcool en volume. | Sucre. | Tannin. | Glycérine. | Cendres. | Matières extractives non dosées. | Acidité totale. | Acidité fixe. | Acidité volatile. | Acide acétique. | Acide butyrique |
| 1 | 1888 | 1,044 | 39,7 | 54,71 | 1,00 | » | 3,00 | 22,49 | 2,40 | 0,95 | 1,45 | 1,31 | 0,21 |
| 2) | 1884 | 1,028 | 37,5 | 42,96 | 1,30 | 1,90 | 2,90 | 17,74 | 3,15 | 2,65 | 0,50 | 0,40 | 0,48 |
| 3) | 1884 | 1,066 | 37,5 | 46,06 | 1,34 | 2,25 | 2,90 | 61,95 | 3,23 | 1,58 | 1,65 | 1,65 | » |
| 4) | 1887 | 0,998 | 47,5 | 24,16 | 1,60 | 1,00 | 2,40 | 10,44 | 2,48 | 1,36 | 1,12 | 0,91 | 0,31 |
| 5) | 1887 | 1,025 | 40,0 | 36,20 | 1,20 | » | 2,50 | 7,10 | 3,57 | 2,43 | 1,14 | 1,14 | » |
| 6) | 1887 | 1,020 | 60,0 | 29,00 | 1,80 | » | 2,80 | 16,00 | 2,61 | 1,71 | 0,90 | 0,82 | 0,13 |
| 7) | 1887 | 1,017 | 33,4 | 37,33 | 1,82 | » | 2,80 | 45,55 | 1,96 | 1,13 | 0,83 | 0,83 | » |
| 8) | 1886 | 1,024 | 17,5 | 43,18 | 1,30 | 0,90 | 2,80 | 29,22 | 2,59 | 1,16 | 1,43 | 1,43 | » |
| 9) | 1886 | 1,022 | 15,0 | 56,00 | 1,34 | 0,85 | 2,85 | 41,16 | 2,56 | 0,87 | 1,69 | 1,69 | » |
| 10 | 1888 | 1,035 | 12,5 | 68,28 | 0,80 | 1,00 | 3,00 | 25,80 | 1,32 | 0,33 | 0,99 | 0,99 | » |
| B. CIDRES DE DIVERSES PROVENANCES | | | | | | | | | | | | | |
| 11) | 1887 | 1,015 | 52,5 | 31,00 | 1,30 | 1,27 | 3,50 | 18,23 | 2,30 | 1,03 | 1,27 | 1,15 | 0,17 |
| 12) | 1887 | 1,005 | 55,0 | 42,87 | 0,80 | 0,70 | 2,60 | 19,33 | 3,78 | 2,45 | 1,13 | 1,13 | » |
| 13 | 1887 | 1,015 | 60,0 | 33,93 | 2,40 | 1,80 | 3,10 | 26,37 | 2,76 | 1,93 | 0,83 | 0,70 | 0,19 |
| 14 | 1888 | 1,029 | 24,1 | 61,54 | 0,60 | 0,60 | 2,80 | 25,86 | 1,04 | 0,61 | 0,43 | 0,32 | 0,16 |

C. CIDRES DE NORMANDIE

| Nos. | Années. | Densité. | Alcool en volume. | Sucre. | Tannin. | Glycérine. | Cendres. | Matières extractives non dosées. | Acidité totale. | Acidité fixe. | Acidité volatile. | Acide acétique. | Acide butyrique. |
|------|---------|----------|----------------------|--------|---------|------------|----------|--|--------------------|------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| 45 | 1886 | 1,035 | 44,5 | 67,44 | 2,20 | 1,80 | 2,50 | 23,96 | 1,21 | 0,80 | 0,41 | 0,38 | 0,04 |
| 46 | 1886 | 1,068 | 33,5 | 46,28 | 2,20 | 1,87 | 2,52 | 68,63 | 2,99 | 1,25 | 1,74 | » | » |
| 47 | 1888 | 1,010 | 50,0 | 46,11 | 1,80 | 1,68 | 2,40 | 44,51 | 1,56 | 0,97 | 0,59 | 0,50 | 0,14 |
| 48 | 1888 | 1,006 | 51,2 | 44,55 | 1,84 | » | 2,43 | 12,68 | 1,74 | 0,85 | 0,89 | 0,89 | » |
| 19 | 1885 | 1,018 | 37,5 | 37,84 | 1,80 | 1,38 | 3,50 | 19,88 | 2,71 | 1,33 | 1,38 | 1,38 | » |
| 20 | 1886 | 1,043 | 52,5 | 28,57 | 1,00 | 2,40 | 2,80 | 14,33 | 2,53 | 1,39 | 1,14 | 1,14 | » |
| 21 | 1886 | 1,006 | 50,0 | 41,84 | 1,58 | » | 2,20 | 12,48 | 2,33 | 1,62 | 0,71 | 0,71 | » |
| 22 | 1888 | 1,030 | 40,5 | 41,35 | 1,60 | » | 2,25 | 20,40 | 2,08 | 1,27 | 0,81 | 0,81 | » |
| 23 | 1886 | 1,029 | 35,0 | 31,45 | 1,60 | » | 2,20 | 21,35 | 1,21 | 0,98 | 0,23 | 0,19 | 0,06 |

D. CIDRES DIVERS NON EXPOSÉS

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|-------|------|---------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|
| 24 | 1888 | 1,020 | 47,5 | 40,58 | 1,10 | 0,41 | 2,50 | 25,21 | 2,52 | 1,96 | 0,56 | 0,56 | » |
| 25 | 1889 | 1,000 | 53,7 | traces. | 0,60 | 2,20 | 2,50 | 10,10 | 2,64 | 1,06 | 1,58 | 1,47 | 0,16 |
| 26 | 1886 | 1,010 | 61,2 | 21,38 | 1,40 | 0,52 | 3,50 | 20,40 | 2,30 | 1,27 | 1,03 | 0,94 | 0,14 |
| 27 | 1886 | 1,029 | 37,5 | 70,00 | 2,10 | 0,78 | 3,00 | 21,82 | 2,30 | 1,21 | 1,09 | 1,09 | » |
| 28 | 1888 | 1,018 | 36,5 | 34,15 | 1,90 | 1,18 | 3,60 | 20,57 | 1,46 | 0,57 | 0,89 | 0,89 | » |
| 29 | 1888 | 1,029 | 32,5 | 65,41 | 2,60 | 0,92 | 2,00 | 19,47 | 1,67 | 0,93 | 0,74 | 0,69 | 0,08 |
| 30 | 1888 | 1,023 | 40,0 | 22,31 | 1,00 | 1,00 | 3,10 | 12,49 | 1,27 | 1,12 | 0,15 | 0,11 | 0,06 |

Tous les nombres des tableaux ci-dessus sont rapportés au litre.

En étudiant ces tableaux, dans lequel les cidres ont été rangés, à peu près, dans l'ordre de mérite qui leur a été donné par le jury de dégustation, on constate tout de suite l'impossibilité de rattacher à aucune condition chimique bien précise le jugement d'ensemble porté sur ces divers produits.

Les cidres qui ont reçu les plus hautes récompenses ne sont ni ceux qui ont le plus d'alcool, ni ceux qui ont le plus ou le moins de sucre, ni les plus riches ou les plus pauvres en tannin ou en acides volatils, ni les plus ou les moins acides. Pour essayer de nous faire une idée des raisons qui avaient motivé le jugement du jury, nous avons soumis nous-mêmes ces cidres, au laboratoire, à une dégustation comparative dont voici brièvement les résultats :

Cidres de Bretagne. Cidre 1. M.O. saveur piquante, parfumé mais plat. — 2. M.V. bon goût, peu de parfum, saveur mêlée de pommes et étrangère. — 3. M.V. bon goût, très agréable à boire. — 4. M.A.G.M. peu de corps, peu sucré, un peu aigre, goût de mois. — 5. M.A.G.M. bon, beaucoup de parfum et de bouquet, peu de corps, pas de saveur à l'arrière-bouche. — 6. M.H. beaucoup de saveur, du fonds, arrière-goût un peu désagréable. — 7. M.A. beaucoup de goût, un peu amer. — 8. M.A. bon goût, du parfum et du corps. — 9. M.A. bon goût, du parfum et beaucoup de corps. — 10. Bon goût, saveur sucrée, piquante, parfumée, arrière-goût net de pommes fraîches.

Cidres de provenances diverses. 11. M.A.G.M. agréable à boire, bon goût, peu de corps. — 12. M.A.G.M. saveur de cidre, un peu amer. — 13. M.B. bon goût, du parfum, un peu amer. — 14. M.H. goût agréable, sucré, peu de parfum, plat, dépôt volumineux.

Cidres de Normandie. 15. M.O. bon, beaucoup de corps. — 16. M.O. excellent, beaucoup de corps. — 17. M.O. peu de parfum, pas de corps, saveur piquante et un peu aigre. — 18. M.O. peu de corps mais saveur agréable, piquant. — 19. M.A.G.M. beaucoup de corps, saveur très agréable. — 20. M.A.G.M. saveur un peu piquante, mais peu de parfum. — 21, 22 et 23. M.A.G.M. saveur de bière, pas de bouquet.

Cidres divers, non exposés. — 24. Saveur, parfum, beaucoup de corps, goût un peu anormal mais bon. — 25. Pas de saveur, pas de mauvais goût, gratte à l'arrière-gorge. — 26. Saveur très amère. — 27. Bon goût, beaucoup de corps, agréable à boire. — 28. Pas désagréable, pas mal de corps, arrière-goût amer, faux goût. — 29. Agréable à boire, saveur acide, un peu plat. — 30. Goût aigre, peu de corps, saveur un peu piquante.

Abréviations. — M.O. médaille d'or, — M.A.G.M. médaille d'argent grand module. — M.A. médaille d'argent. — M.V. méd. de vermeil. — M.B. Méd. de bronze. — M.H. mention honorable.

En comparant les résultats de cette dégustation avec ceux de la dégustation officielle, il nous a paru que dans la distribution des récompenses, le jury avait obéi à des considérations fort diverses, ajoutant de l'importance tantôt à la présence du goût des fruits, tantôt ne tenant aucun compte de son absence, récompensant ici une saveur sucrée, qui est, en effet, du goût d'un certain nombre de consommateurs, surtout dans les grandes villes, récompensant là une saveur un peu plus âpre qui paraît être préférée dans les pays de production. Il a accordé trois récompenses à des cidres auxquels nous avons trouvé une saveur de bière très prononcée. Peut-être s'est-il attaché, d'une manière générale, à donner les premiers rangs aux cidres qui lui paraissaient avoir le plus de chance de durée, c'est-à-dire possédant des qualités qui ne sont appréciables qu'à un dégustateur exercé, mais qui ne correspondent au moins, si l'on se fie aux nombres du tableau précédent, à aucune composition chimique bien déterminée. Cette *chance de durée* peut, en effet, dépendre de circonstances très variables : richesse en alcool, en sucre, en tannin, même en acides volatils, présence ou absence de ces faux goûts qui caractérisent, en général, un commencement de maladie.

A cette cause d'indécision venait s'en joindre une autre. Autant qu'on peut le voir par la comparaison des chiffres relatifs aux matières extractives non dosées, ces cidres provenaient de jus de pommes plus ou moins étendu d'eau.

Pour certains d'entre eux, on serait même autorisé à conclure, de la comparaison des chiffres relatifs aux matières extractives, au sucre et à l'alcool, à la glycérine, qu'il y avait eu addition de sucre. Enfin rien ne serait moins surprenant que l'addition d'un peu d'eau-de-vie à quelques-uns de ces cidres destinés à figurer dans une exposition de l'importance de celle qui a eu lieu à Paris.

Pour toutes ces raisons, il m'a paru qu'il était impossible de m'en tenir à la simple analyse chimique, et que j'avais le devoir d'étudier le côté microbiologique de la question.

Tous ces cidres avaient, en somme, fermenté dans des conditions convenables. C'étaient tous de bons cidres, quelques-uns même étaient supérieurs. Si, comme on commence à le voir maintenant par l'expérience, depuis que M. Pasteur a attiré

l'attention sur ce sujet, la nature de la levure qui a servi à faire fermenter une boisson alcoolique est pour beaucoup dans la saveur du produit, il y avait des chances de trouver, dans ces cidres primés, des levures particulièrement propres à faire de bons cidres. Il est vrai que, à raison des côtés défectueux de la fabrication courante et, en particulier, de la malpropreté qui y règne, ces *bonnes* levures devaient être mélangées à des levures médiocres ou mauvaises, et même à des ferments de maladies. Mais il suffisait, pour séparer ces diverses levures, d'appliquer les procédés usuels de culture sur gélatine; c'est ce que j'ai fait. Toutefois, comme cette opération présente quelques difficultés quand on veut ne pas se perdre, comme on l'a fait jusqu'ici, dans la multitude des levures ainsi isolées, je vais dire brièvement comment j'ai opéré.

II

Au moment de l'ouverture de la bouteille, je prélevais dans le fond, à l'aide d'une pipette flambée, un peu du dépôt que j'enseménçais immédiatement dans du moût de pommes contenu dans un matras Pasteur, dans lequel se faisait le rajeunissement. Puis quand le développement avait eu lieu, on prélevait une goutte du liquide trouble, et, après dilution préalable dans de l'eau distillée stérile, on faisait une culture d'isolement sur gélatine sucrée. Quand les colonies s'étaient formées, on en examinait 6 ou 8 au microscope, et on les enseménçait séparément dans du jus de pommes. Je suis ainsi arrivé à avoir, à un moment, 120 matras Pasteur contenant autant de levures, chacune née d'une seule cellule.

A priori, il devait y avoir dans ces matras beaucoup de doubles, mais il y avait aussi beaucoup de levures différentes par leurs propriétés; le problème était de supprimer les doubles, de réduire ainsi le nombre des espèces cultivées, de les étudier séparément, et de ne conserver que celles qui, ensemencées dans du jus de pommes, donneraient des cidres de bon goût et de bonne conservation.

J'y suis arrivé en utilisant la méthode décrite par M. Duclaux, dans le tome III de ces *Annales*, page 386. Au moyen d'une même boucle de platine, j'ai introduit des quantités approximativement égales de ces 120 levures dans des matras Pasteur, renfer-

mant de l'eau de touraillons sucrée, neutre et additionnée de 5, 10, 15, 20 et 28 grammes d'acide tartrique par litre.

Tous ces ensemencements ayant été faits le même jour et les matras ayant été placés dans la même étuve, on surveillait attentivement, à partir de ce jour, le moment où s'était fait dans chacun de ces matras, une culture assez abondante pour troubler la transparence du liquide.

Des observations faites trois fois par jour m'ont permis ainsi de constater un écart de 12 jours dans les périodes de développement des diverses levures, et je pouvais ainsi les classer provisoirement en un certain nombre de groupes primaires, dont tous les membres avaient pour caractère commun de se comporter à peu près de la même manière, vis-à-vis de milieux également acidulés.

Ces groupes se simplifiaient à mesure que l'acidité du liquide augmentait, parce que quelques-uns de leurs membres, supportant à peu près comme les autres les acidités faibles, se séparaient d'eux, par l'impossibilité où ils étaient de se développer dans des liquides fortement acides. Sans qu'il soit nécessaire que j'insiste, ce qui me conduirait à des détails infinis, on voit qu'il était possible de faire ainsi une première classification en groupes séparés, dont les divers membres *avaient des chances* d'être identiques, mais pouvaient aussi être différents.

Après avoir fait repasser toutes ces levures par un milieu neutre et favorable, pour faire disparaître les causes d'affaiblissement qu'elles pouvaient avoir rapportées de ce traitement par les liquides acidulés, j'ai recommencé la même opération, mais en opérant cette fois sur des milieux faiblement alcalins, d'où une nouvelle classification de laquelle on pourrait dire la même chose que de la première.

D'une manière générale, les levures qui supportent bien les milieux acides souffrent en milieu alcalin et réciproquement. J'avais donc mis en œuvre, pour la séparation de mes espèces, des actions contradictoires dans une certaine mesure, et j'étais fondé à espérer que celles de ces levures qui se retrouvaient ensemble dans les deux classifications pouvaient être identiques. Pour les soumettre à un dernier critérium, j'ai repris individuellement chacune des levures que je jugeais identiques d'après leur place dans les groupes ainsi formés, je les ai ensemencées dans

du jus de pomme ; puis, dès leur premier développement, je les ai étudiées comparativement au microscope pour leur forme, leur grosseur, l'aspect intérieur du globule. On notait aussi l'aspect grenu, floconneux, flottant ou visqueux du dépôt, et cette comparaison, qui ne se faisait à la fois que sur le nombre relativement faible des levures du groupe, permettait immédiatement de reconnaître celles qui se ressemblaient tellement qu'il n'y avait aucun intérêt pratique à ne pas les considérer comme identiques.

En supprimant par cette méthode tous les doubles, en rejetant toutes les levures qui, par leur physionomie, ressemblaient aux levures banales que l'on trouve partout et qui sont généralement peu actives, le nombre de mes levures s'est trouvé réduit à 17 dont 11 ont servi à mes expériences ; les six autres, essayées sur du jus de pommes, ont donné des fermentations lentes, des voiles superficiels et ont été délaissées.

Aux 11 levures que j'ai conservées, j'ai ajouté une levure de poiré, le *saccharomyces apiculatus* retiré d'un cidre, et la levure de vin de Champagne déjà étudiée par M. Duclaux.

J'ai attribué à ces levures les lettres de l'alphabet, de *a* à *o*, sous lesquelles on les retrouve dans le cours de ce travail. Les levures *a* et *b* se distinguent tout particulièrement des autres. Je crois devoir les désigner sous les noms de *saccharomyces mali Duclaux* et de *saccharomyces mali Risler*, pensant ainsi donner à mes vénérés maîtres un faible témoignage de reconnaissance.

Voici la description succincte des levures sur lesquelles a porté mon travail :

La levure *a* est une levure haute ; longueur 6 à 12 μ , largeur 4 à 8 μ ; forme un dépôt légèrement flottant, donne un voile au bout de quelque temps ; se développe péniblement dans l'eau sucrée acidulée à 2 0/0 d'acide tartrique, donne beaucoup de corps et de bouquet au cidre, c'est le *saccharomyces mali Duclaux* ;

La levure *b* est une levure basse, à globules sensiblement sphériques ; dimensions 4 à 6 μ , se développe encore plus péniblement que la première dans la solution à 2 0/0 d'acide tartrique ; dépôt adhérent aux parois du matras, pas de voile ; donne au cidre une saveur bien homogène, je l'ai appelée *saccharomyces mali Risler* ;

La levure *c* est une levure haute très allongée avec vacuoles,

largeur 4 à 6 μ , longueur 6 à 12 et 16 μ , donne au cidre un arôme particulier ;

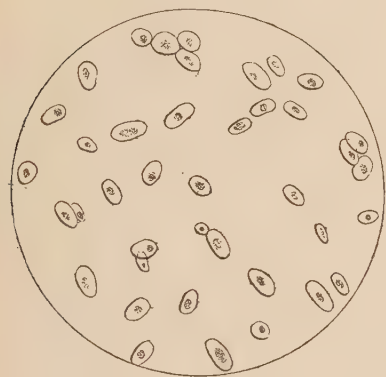


Fig. 1. — Levure *a*.

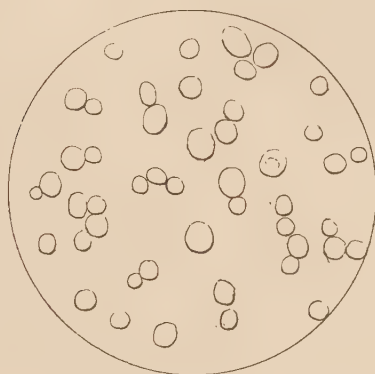


Fig. 2. — Levure *b*.

La levure *d* est une levure haute, supportant assez bien l'acidité du milieu ; longueur 6 à 9 μ , largeur 3 à 6 μ ; forme voile dans les tubes ;



Fig. 3. — Levure *c*.

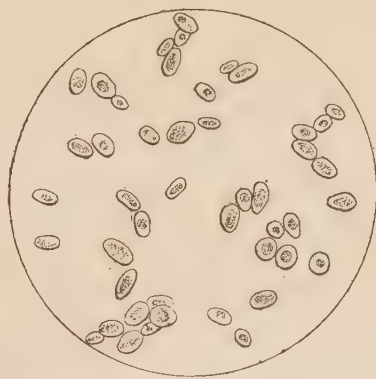
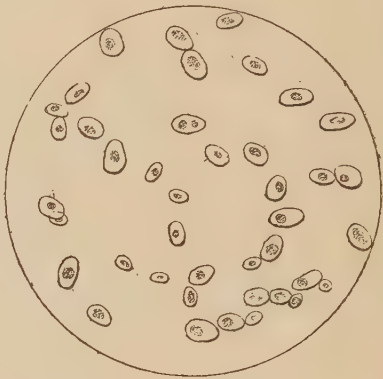


Fig. 4. — Levure *d*.

La levure *e* est une levure basse, globules allongés isolés, à contours peu nets et vacuoles nombreuses ; largeur 3 à 6 μ , longueur 6 à 13 μ ; moins sensible à l'acidité que les levures *a* et *b* ; dépôt un peu flottant ;

La levure *f*, levure basse (?) à globules un peu elliptiques, largeur $\frac{1}{2}$ à $6\ \mu$, longueur 4 à $9\ \mu$; supporte très bien l'acidité du milieu;

Fig. 5. — Levure *e*.Fig. 6. — Levure *f*.

La levure *g*, levure basse, largeur 3 à $6\ \mu$, longueur 4 à $8\ \mu$, se développe très vite, donne un cidre qui s'éclaircit rapidement;

La levure *h*, levure haute, globules allongés; largeur 4 à $6\ \mu$, longueur 8 à $9\ \mu$; a besoin d'une température moins élevée que la précédente, donne un cidre qui s'éclaircit vite;

Fig. 7. — Levure *j*.Fig. 8. — Levure *n*.

La levure *i*, levure basse, largeur 2 à $8\ \mu$, longueur 6 à $13\ \mu$;

La levure *j*, levure haute allongée, globules pyriformes avec vacuoles, sensible à la fois à l'alcalinité et à l'acidité du milieu; largeur 3 à $7\ \mu$, longueur 6 à $13\ \mu$;

La levure *k*, basse, ovale avec vacuoles; dépôt un peu flottant, préfère les milieux neutres, largeur 3 à 6 μ , longueur 5 à 9;

La levure *l* est le *saccharomyces apiculatus* bien connu, ou au moins une des espèces qui peuvent porter ce nom;

La levure *m* est une levure de poiré, basse, à globules allongés, largeur 4 à 7 μ , longueur 7 à 10; elle donne un voile;

La levure *n* est une levure de vin de Champagne, basse, à globules un peu allongés et quelques vacuoles, largeur 4 à 7 μ , longueur 7 à 12;

La levure *o* est très allongée, largeur 1 à 2 μ , longueur 12 à 20 μ ; elle a été retirée d'un cidre ayant quatre ans de bouteille; c'est une levure sauvage, prise comme terme de comparaison.

Pour compléter les caractères distinctifs par une notion qui commence à s'introduire dans l'étude des levures, à la suite des recherches de Reess et des travaux de Hansen, j'ai cherché au bout de combien de temps ces diverses levures donnent des spores, lorsqu'on les étale sur du plâtre, en les soumettant à l'inanition.

Les époques notées dans le tableau qui suit sont celles de la première apparition des spores dans quelques cellules du lot étudié. Il ne m'est jamais arrivé de voir toutes les cellules d'un même lot donner des spores au même moment; presque toujours leur apparition se répartissait sur un certain intervalle, quelques cellules même n'en donnaient jamais. Je ne crois donc pas que cette étude puisse servir, comme on l'a proposé, à savoir si le lot étudié est pur ou s'il est formé d'un mélange d'espèces, moins encore à savoir dans quelle proportion les espèces y sont mélangées; mais elle peut fournir des éléments précieux de comparaison pour mes diverses levures. On trouvera dans le même tableau les limites de résistance des levures et des spores sèches et humides, déterminées par la méthode que j'ai décrite dans un travail antérieur (tome III de ces *Annales*, page 513).

En étudiant les nombres de ce tableau, on voit; en ce qui concerne la formation des spores, que les périodes sont très différentes; en ce qui concerne la résistance, que, comme je l'avais vu dans mon travail cité, il y a une différence moyenne de 5° entre les degrés de résistance des levures et des spores, soit à l'état sec, soit à l'état humide. Mais certaines levures résistent très peu à l'état sec: telle est, par exemple, l'*apiculatus* et la

levure sauvage; la lettre *M* indique que ces levures n'ont pas résisté à la dessiccation à l'étuve à 25°.

| DÉSIGNATION DE LA LEVURE. | DURÉE DE FORMATION DES SPORES. | | LIMITES EXTRÊMES DE RÉSISTANCE | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|-------|--------------------------------|--------|---------|---------|
| | à 15° | à 25° | Levure | Levure | Spores | Spores |
| | | | humide. | sèche. | humides | sèches. |
| <i>a</i> | 84 h. | » | 55° C. | 110° | » | » |
| <i>b</i> | 96 h. | » | 60 | 112 | 60° | » |
| <i>c</i> | 48 h. | 24 h. | 55 | 110 | 55 | 113° |
| <i>d</i> | 360 h. | » | 55 | » | » | » |
| <i>e</i> | » | » | 50 | 80 | » | » |
| <i>f</i> | » | 36 | 50 | 107 | 55 | 110 |
| <i>g</i> | » | 132 | 55 | 115 | » | » |
| <i>h</i> | » | 24 | 50 | 100 | 55 | 110 |
| <i>i</i> | 72 | 24 | 55 | 100 | 58 | 100 |
| <i>j</i> | » | 360 | 50 | 110 | 55 | 115 |
| <i>k</i> | 120 | 96 | 53 | » | 55 | » |
| <i>l</i> | » | » | 45 | M | » | » |
| <i>m</i> | » | 24 | 55 | 100 | » | » |
| <i>n</i> | 96 | » | 50 | 30 | » | » |
| <i>o</i> | » | » | 50 | M | » | » |
| Levure rose. | » | » | 45 | 80 | » | » |
| Levure de M. Roux | » | » | 45 | » | » | » |
| Levure de Képhyr | » | » | 55 | 108 | » | » |
| S. lactis Duclaux. | » | » | 50 | M | » | » |
| S. lactis Adametz. | » | » | 60 | 118 | » | » |

Parmi les levures ajoutées à la fin du tableau, on remarquera que le *saccharomyces lactis* Duclaux, qui fait fermenter le sucre de lait, ne résiste pas non plus à la dessiccation à 25°, tandis que le *saccharomyces lactis* Adametz, qui a la même faculté, résiste à 118° à l'état sec; la levure de champagne est aussi une des levures les plus fragiles, elle résiste très difficilement à la dessiccation.

III

Ce que j'ai dit plus haut au sujet de la dégustation des cidres conduit à penser que le fabricant de cidre peut avoir à se proposer deux buts fort divers: ou bien de faire des cidres dont tout le sucre disparaîtra rapidement, de façon à obtenir des boissons solides et théoriquement immuables, ou bien de laisser dans son cidre une proportion plus ou moins considérable de sucre, pouvant servir, comme dans les bières, à une fermentation ultérieure

et au maintien de la mousse. Pour savoir comment se comportaient mes levures à ce point de vue, je les aiensemencées toutes dans une même quantité de jus de pommes, stérilisé par chauffage, et contenu dans un flacon de verre fermé par un tampon d'ouate. Chacun de ces matras a étéensemencé avec une très faible quantité de l'une des levures, et la fermentation abandonnée à elle-même dans l'étuve. Quand la fermentation préliminaire a été achevée, tous ces ballons ont été retirés de l'étuve, et abandonnés sur une table du laboratoire jusqu'à éclaircissement complet. Je me mettais ici, autant que cela est possible dans une opération en petit, dans des conditions analogues à celle de la grande fabrication, dans laquelle un moût fermenté reste en contact, sinon avec la totalité, du moins avec une partie de sa levure. Puis j'ai cherché, après 3 mois environ de contact, ce qu'il y avait eu de levure formée et ce qui restait de sucre et d'extrait dans chacun de ces ballons.

Les levures qui laissaient du sucre dans ces conditions, où le liquide restait exposé à l'air par sa surface supérieure, une fois la fermentation terminée, en auraient sûrement laissé davantage dans une fermentation accomplie tout à fait à l'abri de l'air, c'étaient des levures à cidre doux; les autres, celles qui laissaient peu de sucre, étaient des levures à cidre sec.

On trouvera, dans le tableau suivant, les levures classées par ordre, suivant la quantité de sucre qu'elles laissent. Il est bien entendu que ce classement n'est pas absolu, qu'il varierait peut-être un peu, si les conditions avaient été autres; nous verrons en effet bientôt qu'il s'est trouvé modifié dans une autre série d'expériences; il ne faut donc l'envisager que dans le sens général que nous lui attribuons.

Le même tableau donne pour chacun de ces essais, en grammes par litre, la quantité de sucre et celle du résidu sec autre que le sucre, le poids de cendres, la quantité de levure produite par litre de moût fermenté, le rapport R entre le poids de sucre disparu et le poids de levure formée, et, sous le nom de degré de fermentation, le rapport de la quantité de sucre disparu à la quantité de sucre initiale. Le moût initial contenait 110 grammes de sucre et 2 grammes 85 de cendres par litre.

On voit, en consultant ce tableau, qu'un certain nombre de nos levures, parmi lesquelles la levure b , pousse presque à bout

la fermentation du sucre contenu dans le moût, et c'est même une question de savoir si le sucre que laissent ces levures, et qui est à peu près en égale quantité partout, est identique à celui qui a disparu. Il ne faut pas oublier, en effet, que le sucre dans ce tableau résulte d'un dosage fait après l'action de l'ac. chlorhydrique, qui peut avoir rendu actif sur la liqueur de Fehling un sucre non directement fermentescible par la levure introduite. Je reviendrai sur ce point, qui exige une étude attentive de la nature des sucres contenus dans la pomme, et de la façon dont ces sucres se comportent vis-à-vis des diverses levures.

| Désignation de la levure. | Sucre total. | Extrait. | Cendres. | Levure produite. | Rapport R. | |
|------------------------------|-----------------|----------|----------|---------------------|---------------|------|
| <i>b</i> | 2,8 | 48,70 | 2,40 | 4,94 | 55 | |
| <i>g</i> | 3,0 | 47,20 | » | 4,90 | 56 | 97,5 |
| <i>i</i> | 3,26 | 24,44 | » | 4,62 | 65 | 97,0 |
| <i>n</i> | 3,30 | 45,60 | 2,40 | 4,88 | 56 | 97,0 |
| <i>j</i> | 3,32 | 21,08 | » | 4,58 | 67 | 96,9 |
| <i>e</i> | 3,36 | 20,54 | 2,60 | 4,40 | 76 | 96,9 |
| <i>h</i> | 3,52 | 20,38 | » | 4,86 | 57 | 96,8 |
| <i>f</i> | 3,54 | 21,56 | » | 4,80 | 59 | 96,8 |
| <i>c</i> | 3,58 | 19,90 | 2,75 | 4,56 | 67 | 96,7 |
| <i>k</i> | 3,58 | 21,12 | » | 4,66 | 64 | 96,7 |
| <i>m</i> | 3,90 | 48,10 | 2,50 | 4,74 | 61 | 96,4 |
| <i>o</i> | 12,80 | 48,40 | » | 2,24 | 43 | 88,3 |
| <i>a</i> | 14,90 | 49,90 | 2,70 | 4,66 | 57 | 86,5 |
| <i>l</i> | 16,00 | 21,40 | 2,40 | 4,68 | 56 | 85,5 |
| <i>d</i> | 16,30 | 20,50 | » | 4,84 | 50 | 83,1 |

Pour le moment, je me borne à remarquer que le *saccharomyces mali* Duclaux, le *saccharomyces apiculatus*, la levure *d* laissent beaucoup de sucre, là où les autres en laissent peu, alors que le poids de levure produite pendant la fermentation est à peu près du même ordre que pour les autres.

La levure *o*, levure banale, sauvage, présente même une particularité à ce point de vue : c'est celle qui s'est le plus multipliée, tout en laissant encore beaucoup de sucre, de sorte que c'est pour elle que le rapport du poids de sucre disparu au poids de la levure produite est le plus faible ; c'est, en effet, le caractère général de ces levures d'avoir un pouvoir fermentatif très peu accusé.

IV

Les essais qui précèdent montrent que les levures que j'ai employées avaient des caractères différentiels assez accusés pour à ce point on fût autorisé à pousser plus loin leur étude, en soumettant à une étude chimique attentive les cidres qu'elles avaient donnés.

Comme cette étude, qui a été faite exactement comme pour les cidres opérés, ne pouvait malheureusement porter sur du jus de grand pressurage naturel, ensemencé avec chacune de mes levures. Aucun contact de filtration ne m'a permis de stériliser ce jus qui est levuré. Il faut absolument le chauffer, et il prend ainsi qu'il y a qui persiste dans le cidre. Heureusement cette question de goût n'a pas beaucoup d'importance pour un cidre qu'on destine à l'analyse chimique, et je pouvais donc soumettre à la fermentation des moûts chauffés, quitte à faire parallèlement, comme nous le verrons bientôt, avec du moût non stérilisé et mes levures, des cidres destinés à la dégustation, auxquels on cherche à conserver une pureté relative.

Voici donc dans un tableau les résultats de l'analyse chimique de cidres produits au moyen d'un moût pur de pommes, obtenu par passage à la presse de pommes broyées, et filtré à l'étamine; il contenait 106 gr. 2 de sucre par litre. Dans ce moût stérilisé, on a ensemencé 14 des levures séparées plus haut et 9 combinaisons de ces levures deux à deux. Puis, la fermentation achevée, on a analysé les cidres par les procédés indiqués plus haut. Dans le tableau, on a laissé de côté le dosage de l'alcool, parce que les flacons étant restés longtemps fermés avec un simple tampon de coton, il pouvait y avoir eu évaporation de ce corps. On s'est surtout attaché à la mesure du sucre restant, à celle de l'extrait, dans lequel ne se trouve pas compris le sucre, et à celle des acides fixes et volatils qui ont été tous, pour la commodité, évalués en acide acétique; en outre on a évalué pour chacun de ces cidres la quantité d'acide acétique et celle de l'acide butyrique.

En ce qui concerne le sucre laissé dans la liqueur fermentée, on voit que l'ordre des levures n'est pas absolument le même que dans le tableau plus haut, cependant celles qui en laissent le plus

sont comme ci-dessus les levures *a*, *d*, et surtout la levure *l* qui est le *saccharomyces apiculatus*.

MOUT STÉRILISÉ (QUANTITÉ PAR LITRE)

| Désignation de la levure. | Sucre restant. | Extrait. | Acidité totale. | Acidité fixe. | Acidité volatile. | Acide acétique. | Acide butyrique |
|---------------------------|----------------|----------|-----------------|---------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| <i>a</i> | 11,15 | 21,25 | 2,57 | 1,65 | 0,92 | 0,92 | » |
| <i>b</i> | 6,87 | 23,13 | 2,00 | 1,73 | 0,28 | 0,28 | » |
| <i>c</i> | 5,15 | 25,45 | 3,39 | 3,32 | 0,07 | 0,06 | 0,02 |
| <i>d</i> | 11,15 | 24,55 | 2,70 | 1,61 | 1,09 | 1,09 | » |
| <i>e</i> | 6,89 | 26,11 | 2,85 | 2,75 | 0,11 | 0,09 | 0,03 |
| <i>f</i> | 4,96 | 25,24 | 4,00 | 3,92 | 0,08 | 0,07 | 0,02 |
| <i>g</i> | 5,36 | 25,05 | 1,84 | 1,66 | 0,18 | 0,16 | 0,04 |
| <i>h</i> | 10,20 | 27,70 | 3,72 | 3,21 | 0,05 | 0,04 | 0,01 |
| <i>i</i> | 5,29 | 24,65 | 3,03 | 2,95 | 0,08 | 0,05 | 0,04 |
| <i>j</i> | 5,56 | 24,24 | 3,05 | 2,98 | 0,07 | 0,05 | 0,03 |
| <i>k</i> * | 5,78 | 26,82 | 3,44 | 3,39 | 0,06 | 0,03 | 0,04 |
| <i>l</i> | 20,75 | 22,55 | 2,76 | 1,67 | 1,09 | 1,09 | » |
| <i>m</i> | 6,16 | 23,84 | 2,12 | 1,37 | 0,75 | 0,75 | » |
| <i>n</i> | 3,80 | 25,80 | 1,85 | 1,67 | 0,18 | 0,18 | » |
| <i>a</i> et <i>l</i> | 5,90 | 24,30 | 3,00 | 2,36 | 0,64 | 0,64 | » |
| <i>m</i> et <i>n</i> | 5,43 | 23,97 | 2,03 | 1,42 | 0,61 | 0,61 | » |
| <i>d</i> et <i>g</i> | 6,15 | 23,10 | 2,60 | 1,78 | 0,82 | 0,82 | » |
| <i>f</i> et <i>k</i> * | 5,86 | 27,54 | 4,19 | 4,14 | 0,05 | 0,04 | 0,02 |
| <i>i</i> et <i>j</i> * | 7,02 | 27,18 | 4,42 | 4,35 | 0,07 | 0,05 | 0,02 |
| <i>d</i> et <i>j</i> | 5,93 | 24,97 | 3,12 | 2,43 | 0,09 | 0,60 | 0,13 |
| <i>c</i> et <i>h</i> * | 6,84 | 26,06 | 4,30 | 4,23 | 0,07 | 0,05 | 0,03 |
| <i>b</i> et <i>l</i> | 9,28 | 23,72 | 2,09 | 1,65 | 0,44 | 0,44 | » |
| <i>a</i> et <i>g</i> | 6,38 | 22,82 | 2,59 | 1,74 | 0,85 | 0,85 | » |

Au sujet de l'acidité totale, on voit qu'elle est, en moyenne du même ordre pour ces cidres d'expérience que pour les cidres primés, mais que l'acidité fixe est plus forte et l'acidité volatile plus faible que dans ces derniers, ce qui démontre que ceux-ci avaient été, partiellement au moins, le siège d'une fermentation étrangère à la fermentation alcoolique. On voit, en outre, que cette acidité totale est très variable de (1,8 à 4,0) avec nos diverses levures, et que la variation de cette acidité est due surtout aux acides fixes. Il faut sans doute attribuer ce fait aux quantités variables d'acide succinique que la levure produit pendant la fermentation, suivant sa façon d'attaquer le sucre, et comme cet acide est par lui-même un corps très savoureux, on comprend qu'il puisse résulter de l'emploi de ces diverses levures des variations de goût très notables pour le cidre produit.

Les acides volatils entrent certainement aussi pour beaucoup dans ces variations de goût, tant par eux-mêmes que par les éthers qu'ils sont capables de former. On voit que cette acidité due aux acides volatils est elle-même très variable (1,09 à 0,05), et de plus qu'elle est produite tantôt par de l'acide acétique pur, tantôt par un mélange avec un peu d'acide butyrique qui est toujours en proportion très faible, inférieure à celle de l'acide acétique. La levure *k* semble faire exception à cette règle, mais là les quantités d'acides volatils étaient tellement faibles qu'il n'y a pas à compter sur les nombres du tableau, que pour cette raison j'ai marqués d'un astérisque, de même que ceux de la levure *k* et des mélanges (*f, k*), (*c, h*) et (*i, j*) qui sont dans le même cas.

Pour les combinaisons de deux levures, on voit que toutes celles qui ne donnent que de l'acide acétique, lorsqu'elles sont isolées, se comportent de même quand elles sont mélangées; mais on relève, dans le tableau, des cas dans lesquels on ne trouve que de l'acide acétique dans un mélange de deux levures dont l'une isolée donnait de l'acide butyrique. C'est que, quand on mélange deux levures, on n'est pas sûr qu'elles se développent en même temps, et on constate quelquefois, même par une simple observation au microscope, que l'une des deux levures écrase plus ou moins l'autre. Cette production d'acides volatils est, du reste, si les idées soutenues par M. Duclaux dans sa Thèse sont exactes, en relation avec le mode d'existence du globule de levure, et en particulier avec son degré d'épuisement, de sorte que leurs proportions peuvent être variables sans que la nature du globule change aucunement.

Ces mélanges de levures permettent aussi, comme on le voit, de faire varier la proportion de sucre non attaqué, qui peut, suivant les conditions de l'expérience, être ou non en rapport avec les quantités de sucre laissées par les deux levures individuellement. Il y a donc place pour une foule de combinaisons possibles, suivant qu'on a des pommes plus ou moins acides, plus ou moins sucrées, suivant qu'on voudra fabriquer du cidre plus ou moins sec ou plus ou moins doux.

V

Mais ces notions, d'ordre tout à fait scientifique, ne nous renseignent nullement sur la saveur *marchande* qu'auraient des

cidres fabriqués avec ces levures diverses. Il nous restait donc à essayer de faire fermenter industriellement du jus de pommes avec ces levures.

Ici se rencontraient plusieurs difficultés. Il faut que ces fermentations soient faites sur un volume assez grand de liquide, pour qu'on puisse avoir confiance dans leurs indications. Je n'ai pas cru devoir abaisser au-dessous de six litres le volume de liquide sur lequel j'ai opéré, et, à cause de la difficulté d'avoir la matière première, j'ai été obligé de réduire le nombre de mes essais, et de me borner à l'étude industrielle de sept levures ou mélanges de levures.

Le fait n'avait du reste pas grande importance, car ce que je me propose dans ce travail n'est pas tant d'obtenir des levures industrielles, que de montrer qu'on peut s'en procurer et par quels moyens.

La seconde difficulté était d'assurer l'ensemencement, à l'état aussi pur que possible, par une levure donnée, d'un jus de pommes que je ne pouvais ni ne voulais chauffer, pour ne pas vicier son goût, et qui échappe à tout autre moyen de stérilisation. J'y suis arrivé en lavant à grande eau d'abord et rapidement tous les ustensiles, broyeurs, pressoirs, bonbonnes et même les pommes, en rinçant le tout ensuite, et à fond, avec de l'eau stérilisée sortant d'un filtre Chamberland. Avec une portion du jus, obtenu alors par les procédés ordinaires, et la levure à étudier, préparée à l'avance en quantité suffisante, on faisait, comme on le fait en brasserie, un *piéd de cuve*, sur lequel on versait ensuite le moût sortant du pressoir. La bonbonne qui contenait le tout était fermée au coton et abandonnée dans le laboratoire, où la fermentation marchait régulièrement. Quand elle commençait à se calmer, on mettait le cidre en bouteilles; en général, cette opération a été faite un peu trop tôt, lorsque la fermentation n'était pas assez avancée; de plus, elle n'était pas au même point partout. L'examen de ces cidres a été fait après environ 3 mois de conservation.

Le tableau suivant, disposé comme celui qui précède, donne les chiffres fournis par l'analyse de ces cidres. On y a joint trois cidres (A, B, C), envoyés au laboratoire en pleine fermentation et donnés, le premier, comme ayant une fermentation régulière et étant de très bonne qualité; le second comme fermentant mal,

c'est-à-dire avec des caractères objectifs qui n'étaient pas ceux que le praticien est habitué à trouver à une bonne fermentation ; le dernier comme fermentant trop vite, ce qui est encore un défaut que l'expérience a appris à redouter.

MOUT NON STÉRILISÉ (QUANTITÉS PAR LITRE)

| Désignation de la levure. | Alcool en volume. | Sucre restant. | Extrait. | Acidité totale. | Acidité fixe. | Acidité volatile. | Acide acétique. | Acide butyrique. |
|---------------------------|-------------------|----------------|----------|-----------------|---------------|-------------------|-----------------|------------------|
| <i>a</i> | 31,44 | 26,77 | 19,83 | 3,00 | 1,53 | 1,47 | 1,40 | 0,11 |
| <i>b</i> | 41,18 | 16,40 | 21,90 | 1,69 | 1,34 | 0,35 | 0,35 | » |
| <i>c</i> | 39,36 | 27,60 | 26,70 | 2,15 | 1,85 | 0,30 | 0,27 | 0,04 |
| <i>h</i> | 44,25 | 14,10 | 24,30 | 3,82 | 3,61 | 0,21 | 0,18 | 0,03 |
| <i>n</i> | 36,66 | 35,80 | 27,80 | 1,78 | 1,40 | 0,38 | 0,34 | 0,06 |
| <i>a et l</i> | 28,50 | 34,69 | 22,01 | 3,25 | 1,72 | 1,53 | 1,53 | » |
| <i>d et j</i> | 49,50 | 12,10 | 21,70 | 3,39 | 3,17 | 0,22 | 0,21 | 0,02 |
| A | 49,24 | 25,40 | 29,10 | 2,41 | 1,56 | 0,85 | 0,82 | 0,06 |
| B | 29,37 | traces | 18,70 | 5,59 | 1,41 | 4,19 | 4,19 | » |
| C | 44,16 | traces | 18,80 | 5,55 | 1,26 | 4,29 | 4,29 | » |

En comparant les nombres de ce tableau à ceux du tableau précédent, on voit d'abord que l'acidité totale est comprise entre les mêmes limites que plus haut, et que seuls les cidres (B, C), donnés comme mauvais, la dépassent sensiblement. Il se confirme donc que l'acidité d'un cidre normal fait avec du jus de pommes non étendu d'eau, ne doit pas dépasser 4 grammes d'acide acétique par litre, et on peut conclure aussi, quand elle dépasse ce chiffre, que l'excédent est dû à un notable développement d'acides volatils, qui, dans le cas des cidres B et C, est précisément de l'acide acétique. Cet acide est le résultat d'une véritable acétification ; il doit être complètement distingué de l'acide acétique normal, produit par certaines levures.

On voit aussi dans le tableau que des levures qui, en mout stérilisé, n'ont donné que de l'acide acétique, ont fourni ici de l'acide acétique mélangé d'une proportion variable d'acide butyrique : tel est le cas pour la levure *a* ; le fait peut s'expliquer soit par un changement dans le mode d'existence du globule, soit aussi, de préférence, par le mélange de la levureensemencée avec une des levures présentes à la surface des fruits, et que le lavage n'aurait pas complètement éliminée.

Dans cet ordre d'idées, le cidre obtenu par le mélange (*d, j*),

mérite une mention spéciale; la levure *d* fournit des quantités notables d'acide acétique; la levure *j*, des quantités faibles d'un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique. Tel est aussi le cas du cidre (*d, j*); il semble donc que dans ce dernier, ce soit la levure *j* qui ait été prédominante. Il suffisait, en effet, d'une simple observation au microscope pour voir que cette levure, très vigoureuse, dominait dans le cidre et avait écrasé la levure *d*, plus délicate et donnant une dose plus notable d'acides volatils.

Ces deux levures provenaient toutes les deux d'un cidre excellent ayant obtenu une médaille d'or, et duquel nous avons retiré l'*apiculatus* qui nous a servi dans nos essais. Nous nous attendions donc, en soumettant tous nos cidres à la dégustation, à trouver le cidre (*d, j*) à un bon rang.

Voici les résultats de cette dégustation faite en double : une fois au laboratoire, une autre fois en ayant recours à la compétence de M. Néron, membre du bureau d'administration de l'Association pomologique de l'Ouest.

Cidre *a*. — Saveur pleine, parfumée; liquide limpide; bon cidre, sera meilleur quand il aura encore fermenté un peu; la levure est pure.

Cidre *b*. — Goût agréable et franc, saveur homogène mais pas très relevée; deux bacilles par champ dans le dépôt.

Cidre *c*. — Inférieur aux précédents, un peu plat à l'arrière-gorge; on trouve par-ci par-là en cherchant bien un bacille; dans une autre bouteille on avait trouvé une sarcine, et le cidre de cette bouteille était alors tout à fait défectueux.

Cidre *h*. — Saveur franche, mais à peine du parfum; laissant un sentiment de sécheresse au bout de la langue; au laboratoire on le juge médiocre, M. Néron pense qu'il pourrait faire un cidre de conserve; il renferme, en effet, peu de sucre, le cidre étant très limpide; la levure est pure.

Cidre *n*. — C'est le cidre fait avec de la levure de champagne. Pour ce cidre, les jugements ont été très variés, M. Néron l'a jugé un peu plat: on lui trouve, au contraire, au laboratoire une odeur agréable, une saveur franche et le bouquet musqué que cette levure communique à tous les liquides qu'elle fait fermenter, mais ce bouquet n'est certainement pas un bouquet de cidre, c'est un bouquet de vin, et c'est peut-être là ce qui explique la différence des jugements portés.

Cidre (*a, l*). — M. Néron trouve que c'est le meilleur; il le juge supérieur au cidre *a*; la saveur est pleine, le bouquet prononcé; il renferme encore un peu trop de sucre, plus que le cidre *a*, quoiqu'il date de la même époque; les deux levures sont seules, développées toutes les deux et pures.

Cidre (*d, j*). — Ici les jugements sont unanimes pour trouver à ce cidre un goût plat, il donne une impression de sécheresse à la langue, et n'a d'autre saveur que celle qui provient de l'acide carbonique. Quand, suivant la méthode employée au laboratoire pour la dégustation, on le conserve dans la bouche, en le faisant traverser pendant quelques secondes par des bulles d'air filtrées entre les dents, de façon à l'aérer et à le débarrasser de son acide carbonique, il devient tout à fait plat et sans saveur.

La première idée, comme ce cidre est encore un peu trouble, est qu'il renferme des ferments étrangers; l'examen microscopique montre qu'il n'en est rien, et que les levures qu'il contient sont pures, la levure *j* étant prédominante comme nous l'avons dit.

Ces deux levures, de même que la *saccharomyces apiculatus* qui, comme le montre la dégustation précédente, fournit de bons cidres, provenaient pourtant d'un cidre qui avait eu la médaille d'or, et il est clair que, dans ce cidre, il y avait au moins ces trois levures, dont deux, les levures *d*, et *l*, sont de bonnes levures, qui se trouvent associées à une levure *j*, très défectueuse, probablement peu développée dans le cidre initial puisque celui-ci était resté bon, et ayant pris le pas sur les autres dans nos essais, grâce à sa vigueur.

Dans le cidre (*a, l*), l'introduction de l'*apiculatus*, qui était resté très reconnaissable au microscope, relève notablement le bouquet du cidre, et il ne me paraît pas douteux qu'un cidre fabriqué exclusivement avec cette levure qui, du reste, est par excellence une levure de fruits, serait un cidre très parfumé. Malheureusement cette levure ne prend pas vite possession du milieu, et risque d'être écrasée par des levures voisines plus vigoureuses, mais moins parfaites. C'est ce que M. Pasteur avait déjà remarqué à propos des vins. Mais on peut, en ensemençant à l'avance le moût d'une façon un peu copieuse, assurer sinou la prédominance, du moins une large part à l'*apiculatus* dans la fermentation, ce qui, d'après les essais ci-dessus, a pour avantage

de ralentir la fermentation, de laisser dans le cidre une plus forte dose de sucre, et d'augmenter la valeur marchande de la boisson fermentée.

Il est remarquable que les deux meilleurs cidres de la série sont ceux dans lesquels la quantité d'acides volatils produits par la levure est la plus grande, cet acide étant du reste surtout de l'acide acétique.

Le cidre A, fermenté évidemment avec un mélange de levures, a aussi une dose assez notable d'acides volatils. Les cidres B, et C, qui le dépassent sur ce point, ne doivent leur acidité qu'à une fermentation acétique, et sont par conséquent hors de cause.

D'un autre côté, les deux plus mauvais cidres sont ceux qui renferment le moins d'acides volatils. Il semble donc qu'il faille ajouter une importance véritable à ces acides, sinon comme agents uniques, du moins comme facteurs importants de la saveur du produit.

Nous voyons en résumé qu'il existe de très bonnes et de très mauvaises levures à cidre, et que, pour cette boisson, les levures sont très loin d'être disciplinées comme elles le sont naturellement pour les vins ou artificiellement pour les bières. Nul doute qu'on ne puisse arriver à la même stabilité pour la fermentation du jus de pommes que pour celle du jus de raisin ou du moût d'orge.

Mais au point où nous en sommes arrivés, il me semble que le laboratoire nous a appris tout ce qu'il pouvait nous apprendre dans cette voie, et que, pour faire un pas de plus, il faut s'adresser à de véritables opérations industrielles.

Les opérations faites en petit sont, en effet, très difficiles à conduire, et tandis qu'en grand il arrive très souvent, sinon toujours, que le moût fermente spontanément, cela est, au contraire, très rare quand on fait les fermentations en petit. Les propriétés du liquide fermenté ne sont en outre pas les mêmes, et certainement nos cidres eussent été bien meilleurs s'ils avaient été faits plus en grand; de plus nous n'avons pu tenir compte ni du choix des variétés de pommes, ni des crus, tout aussi bien dessinés à propos du cidre qu'à propos du vin, ni des variations apportées dans la constitution du jus des pommes par la durée plus ou moins longue de conservation à laquelle ces pommes

ont été soumises. Tout ceci ne peut se faire que sur les lieux, dans une grande ferme-école ou une cidrerie. Mais lorsqu'on disposera des conditions favorables, la marche des expériences à faire me semble tout indiquée. Le laboratoire de fermentations tient à la disposition de ceux qui en auraient besoin des cultures pures des levures que j'ai isolées, ou peut prélever dans les bons cidres qu'on lui enverra les levures qui ont servi à les fabriquer. Ces levures étant préparées d'avance en quantité suffisante, pourront servir à ensemer des pieds de cuve, faits avec les précautions de propreté méticuleuse que nous avons dû prendre dans nos expériences, et qui suffisent, comme nous l'avons vu, à assurer sans stérilisation préalable la prise de possession du liquide par une levure déterminée. Ces pieds de cuve, dont on proportionnera le volume à celui du cidre à préparer, suffiront à leur tour à assurer la large prédominance de la levureensemencée dans la fermentation, et il ne restera plus qu'à traiter par les procédés ordinaires les cidres ainsi obtenus, et à chercher quels sont ceux qui sont les meilleurs.

En terminant, je m'empresse de remercier M. Power, vice-président de l'Association pomologique de l'Ouest, à Saint-Ouen de Thouberville (Eure), et M. Néron, membre fondateur de l'association pomologique à Pierrefitte-en-Auge (Calvados), qui ont bien voulu nous faire cadeau des pommes nécessaires pour nos essais.

Je remercie également de son obligeance M. Lacaille, pépiniériste à Frischemesnil (Seine-Inférieure). Toutes nos expériences eussent été impossibles si nous n'avions pas rencontré, dans les pays à cidre, ces bonnes volontés actives.

Ce travail a été fait au laboratoire de fermentations de l'Institut national agronomique, sous la haute direction de mon savant maître M. Duclaux; je suis heureux de pouvoir lui exprimer ici mes remerciements pour les excellents conseils qu'il n'a cessé de me donner.

SUR LES PROPRIÉTÉS CHIMIOTACTIQUES DES LEUCOCYTES

PAR LE D^r G. GABRITCHEVSKY, DE MOSCOU.

(Travail du laboratoire de M. E. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur.)

I

Sous le nom de chimiotaxie (*Chemiotaxis*), M. Pfeffer a désigné, le premier, une propriété particulière des organismes végétaux inférieurs doués de mobilité, propriété qui se manifeste par leur mouvement vers certaines substances ayant sur eux une action chimique. Dans les dix dernières années, les botanistes ont recueilli sur ce sujet des données nombreuses, fort intéressantes aussi pour les savants qui s'occupent de physiologie et de pathologie animales. Il résulte, en effet, de recherches récentes, — il est vrai peu nombreuses encore, — que les leucocytes sont capables de mouvements amiboïdes et manifestent, eux aussi, les mêmes propriétés chimiotactiques.

Dans ses recherches botaniques, M. Engelmann¹ observa, le premier, que certaines substances chimiques excitaient les organismes mobiles inférieurs, et prouva que l'oxygène est un excitant énergique pour les bactéries. Le travail de M. Stahl² apporta ensuite des faits d'une grande importance dans la question qui nous intéresse ici. M. Stahl a fait ses observations sur le plasmodium d'*Ethalium septicum* qui vit ordinairement dans l'infusion d'écorce de chêne. Ce plasmodium, placé à la surface d'un verre humide, reste immobile jusqu'à ce qu'on ajoute à l'eau de l'infusion d'écorce de chêne. Il se dirige alors rapidement vers celle-ci. En mettant le plasmodium en contact, mais par

1. Bot. Ztg., 1881.

2. Zur Biologie der Myxomyceten. Bot. Ztg., 1884.

une de ses parties seulement, avec d'autres liquides, par exemple avec une dissolution de glucose à 1/4, 1/2 %, on obtient un autre résultat : le plasmodium fuit la solution sucrée. Même résultat avec différents sels. Ce qu'il y a surtout d'intéressant dans les expériences de M. *Stahl*, c'est le fait d'une habitude prise par le plasmodium pour certains excitants chimiques. Ainsi, si l'on répète plusieurs fois l'expérience avec la dissolution de glucose, on remarquera que le plasmodium ne la fuit plus, mais, au contraire, se dirige vers elle, comme auparavant il se dirigeait vers l'infusion d'écorce de chêne.

Ces faits intéressants, recueillis par M. *Stahl*, sont confirmés par quelques observations de M. *de Bary* sur les manifestations vitales des myxomycètes¹, bien que l'auteur ne fasse connaître son opinion qu'avec beaucoup de réserve. D'après M. *de Bary*, les plasmodiums n'absorbent que les parcelles solides d'origine organique, tels que : débris de cellules mortes, spores, grains d'amidon, grains de couleurs, etc. M. *de Bary* ajoute ensuite avec raison que l'absorption de ces parcelles par les organismes végétaux n'est pas un phénomène déterminé exclusivement par leur nature chimique ; mais elle dépend également des différentes propriétés des plasmodiums. Ainsi, tandis que le *Dydimium Scirpula* absorbe des masses de grains de carmin, le *Chondrioderma difforme* n'en absorbe que très peu.

Dans le courant de la même année, M. *W. Pfeffer* élargit considérablement le domaine des observations sur les propriétés chimiotactiques des organismes inférieurs. M. *Pfeffer* démontra qu'il existe pour quelques-uns de ces organismes des excitateurs pour ainsi dire spécifiques, comme, par exemple, l'acide malique pour les filaments séminaux des Fougères et des Sélaginelles. Pour d'autres (gamètes de *Chlamydomonas pulvisculus* et *Ulothrix zonata*), on n'a pas trouvé de substances capables d'augmenter leur mobilité. Pour les bactéries mobiles, toute bonne substance nutritive (extrait de viande) possède des propriétés attractives. Enfin M. *Pfeffer* démontra que la chimiotaxie attractive est déterminée par la nature spécifique des substances chimiques, et non par des mouvements de diffusion des liquides.

1. Cas IX. Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien. Leipzig, 1884.

2. Beitrag zur Kenntniss der Chytridiaceen. 1886, S. 12.

Vinrent ensuite les observations de M. *Rosen* sur les spores de *Chytridium zygneumatis*, qui sont attirées par les produits de la décomposition des cellules mortes de zygnèmes¹; celles de M. *Zopf*, également sur les zoospores de quelques Chytridiacées qui sont attirées par les grains de pollen, et enfin les deux derniers traités de botanique de MM. *Pfeffer* et de *Stange*. — Dans son dernier ouvrage, M. *Pfeffer* nous donne un aperçu détaillé sur les substances chimiques ayant une action chimiotactique sur les bactéries, les Ciliaires et les Volvocinées. Toutes ces substances chimiques peuvent être classées en deux grands groupes : substances avec chimiotaxie positive et négative.

Pour orienter le lecteur, je présente ici le tableau suivant des observations de M. *Pfeffer*.

I. — Possèdent la chimiotaxie positive :

1. *Substances organiques* : Peptone (énergique), asparagine, créatine, taurine, sarcine, carnine, urée (faible), dextrine, — excitant énergique pour quelques-uns seulement, — glucose.

2. *Substances inorganiques* : Salicylate de sodium, morphine, sels de rubidium.

II. — Possèdent la chimiotaxie négative :

1. *Substances organiques* : Alcool.

2. *Substances inorganiques* : Acides libres, alcalis, sels (lactate de fer et sulfate de zinc).

Les observations analogues de M. *Stange* sur les zoospores de *Saprolegnia* et les Myxomycètes l'ont amené à cette conclusion : 1° que les zoospores et les myxamibes présentent une grande sensibilité pour les divers excitants chimiques; 2° que l'irritabilité des plasmodes diminue très sensiblement avec l'âge; 3° que les propriétés individuelles des zoospores se manifestent aussi visiblement que dans les organismes les plus compliqués. Souvent les zoospores d'un seul et même sporange sont tantôt indifférentes, tantôt très excitables. En particulier et en ce qui concerne les zoospores, M. *Stange* trouva que les substances suivantes provoquent la chimiotaxie positive : acide phosphorique et ses combinaisons alcalines et alcalino-terreuses, extrait de viande, lécithine, acide acétique (0,01 %). Les substances suivantes sont, au contraire, ou indifférentes ou bien possèdent

1. Bot. Ztg., 1890, nos 7-11.

la chimiotaxie négative : ammoniacque libre ($1/2 - 1\%$), soude, potasse et tous leurs composés, acides chlorhydrique, sulfurique et azotique ($0,01 - 0,1\%$), enfin quelques substances organiques : glycérine, leucine, glucose et lactose.

Les myxamibes possèdent des propriétés chimiotactiques bien différentes de celles des Saprologniées ; ainsi la myxamibe du *Chondrioderma difforme* n'est attirée que par l'acide malique ($0,5\%$), l'acide lactique (ou par leurs sels de sodium, de potassium et de lithium), par l'acide butyrique et l'asparagine. Sont indifférents : les phosphates, les sulfates, les azotates et les chlorates de potassium et d'ammoniacque, ainsi que les composés inorganiques des acides phosphorique, citrique, tartrique et tannique, et, parmi les substances organiques : la glycérine et la glucose. La chimiotaxie négative a été démontrée pour l'éther éthyl-malique.

Les myxamibes d'*Æthaliium septicum* sont attirées surtout par les acides lactique, butyrique, valérianique et propionique ; plus faiblement par les acides lactique et tartrique. Toutes les substances inorganiques, ainsi que la glycérine, la glucose, le saccharose, l'urée, l'acide citrique, l'asparagine et les acides tannique, phosphorique et formique se sont montrées indifférentes.

Par cette énumération des substances chimiques possédant, par rapport aux zoospores de *Saprolegnia* et aux myxamibes des Myxomycètes, la chimiotaxie positive, indifférente ou négative, on voit de quelle manière frappante se dessinent les traits individuels des organismes végétaux inférieurs. Si nous nous rappelons que les mouvements de translation de ces organismes sont déterminés par diverses influences extérieures, connues sous le nom d'héliotropisme, hydrotropisme, rhéotropisme, thermotropisme et ainsi de suite, nous comprendrons la complexité et la subtilité des phénomènes qu'on observe dans les êtres inférieurs. Le grand mérite de la botanique contemporaine est précisément d'avoir étudié et expliqué ces phénomènes compliqués de la vie de ces organismes.

Ces données doivent servir de base à des recherches zoologiques nouvelles sur les animaux monocellulaires inférieurs. Ce n'est cependant pas là un sujet tout à fait neuf pour les zoologistes. La théorie des phagocytes, d'ailleurs très peu comprise

par beaucoup de savants, a exprimé nettement la nécessité d'étudier les propriétés spéciales que possèdent les amibes et les leucocytes, d'être attirés par certaines substances et repoussés par d'autres.

Le fait incontestable de la phagocytose ne pouvait s'expliquer que par certaines particularités vitales des leucocytes et, entre autres, par leurs propriétés chimiotactiques. Dans ses nombreux articles sur la phagocytose, M. Metchnikoff ne parle pas de la chimiotaxie; cependant, les explications qu'il donne à propos des contradictions apparentes de sa théorie sont confirmées par les recherches nouvelles sur la chimiotaxie des leucocytes.

D'après les observations de M. Metchnikoff sur la digestion intracellulaire des cellules mésodermiques, ces dernières n'absorbent pas sans exception tout ce qu'elles rencontrent sur leur chemin, mais, au contraire, elles choisissent certaines substances, ce qui dénote leur faculté de distinguer¹. Dans un autre mémoire à propos de la question de l'immunité acquise, M. Metchnikoff rattache cette immunité à l'*habitude progressive des phagocytes* de s'assimiler les substances qu'ils évitaient au début². Sans doute la théorie de la phagocytose présentait une lacune qui, à présent, peut être comblée par une étude détaillée des propriétés vitales des leucocytes. Aussi se trouve-t-elle confirmée dans beaucoup de cas. Ainsi on trouve, pour la première fois, l'explication de la phagocytose par les phénomènes chimiotactiques dans le travail de M. Peckeltharing³, qui introduisait sous la peau de grenouilles de petits morceaux d'ouate imbibée de liquides indifférents et de cultures de charbon. Après quelques heures, les morceaux d'ouate imprégnés de bactéries renfermaient beaucoup plus de leucocytes que ceux qui avaient été trempés dans les liquides indifférents, d'où l'auteur a conclu que les microbes dégagent une substance particulière qui attire les leucocytes.

Le mémoire de M. J. Massart⁴, paru dans la même année,

1. Untersuchungen ueber die intracelluläre Verdauung bei wirbellosen Thieren, Vienne, 1883, Ueb. die pathologische Bedeutung der intracellulären Verdauung, Fortschritte der Medici, 1883, p. 515.

2. Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen. Virch. Arch., 97, 1884, p. 515.

3. La Semaine médicale, n° 22, 1889, p. 184.

4. Archives de biologie, t. IX, 1889, p. 515.

sur la sensibilité et l'accommodation des organismes animaux et végétaux aux dissolutions salines de concentrations variées, touche à plusieurs points importants dans la question de la chimiotaxie. Les bactéries et les infusoires ciliés se comportent d'une manière différente vis-à-vis des solutions de sels concentrées.

1° Les uns évitent ces solutions (*Spirillum Undula*, *Bacillus Megatherium*, *Chilomonas Paramœcium* et *Bodo Saltans*).

2° D'autres entrent dans les solutions en perdant l'eau de leur contenu protoplasmique.

3° Enfin il y a de ces organismes qui entrent et qui s'accommodent immédiatement à la concentration, tout en demeurant immobiles (*Bacterium Termo* et *Tetramitus Rostratus*).

Je m'arrêterai encore sur ce dernier fait pour dire que, en ce qui concerne les organismes végétaux inférieurs, l'habitude et l'accommodation à de certains liquides est un phénomène bien établi.

MM. J. Massart et Ch. Bordet ¹ ont fait, en février 1890, à la Société royale des sciences médicales et naturelles de Bruxelles, une communication sur l'excitabilité des leucocytes et sur le rôle de cette excitabilité dans la nutrition des cellules et dans l'inflammation.

Je n'extrais de ce travail, qui est la première recherche systématique sur l'excitabilité des leucocytes, que les résultats des observations sur la chimiotaxie de ces cellules, laissant de côté leur sensibilité tactile. Dans ses traits essentiels, la méthode de recherche de ces auteurs est la même que dans les travaux de M. Pfeffer. Voici en quoi elle consiste : des tubes capillaires en verre sont remplis du liquide à étudier et fermés à la lampe à une extrémité, puis ils sont introduits dans un milieu qui contient des leucocytes (cavités lymphatiques de la grenouille). Ces observateurs ont étudié de cette manière les cultures de *Staphylococcus pyogenes albus*, de *Bacillus cholerae gallinarum*, de *Bacillus typhi abdomin.*, de *Bacillus anthracis*, etc.

Les tubes capillaires remplis de ces cultures sont introduits dans la cavité abdominale de grenouilles et on les y laisse pendant 24 heures. On constate qu'au bout de ce temps des masses

1. Journal publié par la Société royale des sciences médicales et naturelles de Bruxelles, 1890, V. aussi ces Annales, t. IV, numéro d'avril.

de leucocytes ont pénétré dans les tubes. D'après ces savants, parmi les microbes mentionnés, les premiers sont ceux qui attirent le plus de leucocytes. Le liquide nutritif dans lequel on cultive les bactéries n'attire pas les leucocytes tant qu'il est pur; par conséquent, les leucocytes possèdent la chimiotaxie positive par rapport aux bactéries elles-mêmes ou à leurs produits chimiques. Les expériences faites avec les cultures stérilisées ont témoigné de l'action attractive exercée sur les cellules blanches par les produits élaborés par les microbes. Il résulte encore des observations de MM. J. Massart et Ch. Bordet que la sensibilité tactile et chimique des leucocytes peut être temporairement détruite par le chloroforme ou le chloral hydraté. Soumis à l'action de ces substances, les leucocytes de la grenouille ne sont plus attirés par les cultures des bactéries.

Cette revue des travaux déjà publiés sur la question qui nous occupe ici, permet de conclure que non seulement les organismes végétaux inférieurs possèdent des propriétés chimiotactiques, mais que les cellules des animaux inférieurs et supérieurs manifestent aussi ces mêmes propriétés à un degré très marqué.

II

La méthode dont se sont servis MM. Pfeffer, Stange, Massart et Bordet n'est pas compliquée et donne d'excellents résultats. Je l'ai employée dans les recherches qui suivent. On stérilisait les dissolutions de substances avant de s'en servir. Les cultures des bactéries étaient faites dans du bouillon, puis stérilisées, si c'était nécessaire, par une température de 120° C. ou par la filtration (filtre Chamberland). Les solutions de jéquirity et de papayotine ont été préparées par ce dernier procédé, parce que la chaleur leur fait perdre leurs propriétés principales. Les liquides purs ainsi obtenus étaient introduits dans des tubes capillaires stérilisés de 15 à 20 mill. de long et de 0,3 mill. de diamètre. Quand on opérait sur les grenouilles, on lavait la peau avec une dissolution de sublimé au 1/1000, après quoi on faisait une petite incision dans la peau et on introduisait ainsi 3 ou 4 tubes. Dans les expériences sur les lapins on coupait d'abord, avec des ciseaux, le poil des oreilles et on les lavait ensuite avec du sublimé. Puis on pratiquait avec une aiguille

stérilisée un canal dans le tissu cellulaire sous-cutané, et l'on faisait pénétrer dans ce conduit les tubes remplis de liquide. Chez les larves des grenouilles et des axolotls blancs, les tubes étaient introduits dans la queue, et tandis que les bouts ouverts des tubes se trouvaient dans le tissu, leurs bouts fermés sortaient en dehors. Si l'on met préalablement l'axolotl ou le têtard dans une solution faible de curare après lui avoir fait une incision au bout de la queue, après 5-10 minutes la larve est complètement paralysée, ce qui permet d'introduire facilement le tube. Les larves curarisées d'axolotls peuvent vivre plusieurs jours dans un endroit humide et présentent un magnifique objet d'observations microscopiques.

On laisse les tubes dans le corps des animaux pendant 24 heures au plus; on les retire, on détermine par l'examen microscopique le nombre de leucocytes, on cherche s'ils sont vivants et s'il n'y a pas eu d'infection accidentelle par des bactéries. Comme ces dernières attirent ordinairement un grand nombre de leucocytes, on étale le contenu du tube sur le verre et, afin de pouvoir l'examiner commodément, on colore avec du bleu de méthylène. De semblables préparations permettent d'observer l'activité phagocytaire des leucocytes et l'infection par des bactéries étrangères. Pour recueillir le contenu du tube, on brise le bout fermé et on l'approche de la flamme d'un bec Bunsen; en même temps, on applique à l'autre extrémité la lamelle de verre; le contenu du tube tombe alors sur le verre.

Il est ainsi facile de compter approximativement le nombre de leucocytes. Les expériences où ils se trouvent seulement par unités sont marquées dans les tableaux qui suivent du signe (o), celles où on les compte par dizaines du signe (oo), et enfin celles où on les rencontre par centaines sont désignées par les signes (ooo), (ooooo).

Pour ce qui concerne le choix des substances chimiques que j'étudiais, je me suis guidé généralement par le principe que ce sont les cultures des bactéries et les produits de leur activité vitale qui attirent surtout et le plus les leucocytes. Il était intéressant, en outre, d'étudier les substances telles que le jéquirity, la papayotine, l'acide lactique, le bicarbonate de sodium, qui, d'après les observations de plusieurs auteurs, exercent une grande influence sur le développement des bactéries dans l'organisme.

III

Si l'on jette un coup d'œil sur les tableaux qui sont à la fin de ce mémoire et qui résument mes expériences, on remarquera avant tout, que la plus grande quantité de leucocytes se trouve dans les tubes contenant les cultures, stérilisées ou non, de différents microbes, tandis que les tubes avec d'autres substances ou renferment beaucoup moins de leucocytes ou n'en renferment pas du tout. D'où vient cette différence? Nous savons déjà comment MM. Massart et Bordet expliquent ce phénomène; pour ma part, j'accepte leur explication.

Toutefois, comme il y a d'autres conditions qui pourraient agir sur les leucocytes simultanément et de la même manière, je crois utile de les viser avant de maintenir ma manière de voir. Les leucocytes du sang peuvent s'amasser dans les tubes ou passivement ou activement. On peut supposer qu'un tube mis sous la peau d'un animal excite mécaniquement les tissus qui l'entourent, et que, par suite d'une hyperhémie et d'une agglomération de leucocytes en cet endroit, ces derniers sont forcés d'entrer dans le tube. Mais pourquoi les tubes qui contiennent des bactéries sont-ils les seuls à se remplir de leucocytes, tandis que d'autres tubes semblables, exerçant la même excitation mécanique, mais renfermant des substances inactives, ne contiennent pas de cellules blanches? Il est clair que c'est le contenu des tubes qui joue ici un grand rôle.

Comme la concentration des liquides n'est pas la même dans tous les cas, on pourrait supposer que, par suite de la diffusion, les leucocytes sont entraînés mécaniquement et passivement par les courants liquides dans les tubes. Cette hypothèse ne soutient pas l'examen; en effet, des solutions de divers sels à 10 0/0 introduites dans les tubes ne provoquent pas l'agglomération des leucocytes, et cependant ces dissolutions salines, dont la composition est si différente de celle de la lymphe et du sang, provoquent dans les tissus des courants liquides bien plus intenses que le bouillon qui sert à la culture des microbes.

Il faut donc admettre que les leucocytes n'entrent pas dans les tubes par suite d'actions physiques, mais activement, en vertu de leurs propriétés vitales. Or, nous savons que ces propriétés se manifestent ou par leur sensibilité tactile ou par

leur sensibilité chimique. Sans doute, la sensibilité tactile peut se manifester dans ces conditions, et nous avons pu observer maintes fois les leucocytes collés sur la paroi extérieure des tubes placés sous la peau d'un animal; mais ce n'est pas en vertu de la sensibilité tactile que les leucocytes pénètrent dans les tubes dont le contenu liquide renferme des particules solides, car le carmin en poudre suspendu dans l'eau distillée (n° 73) n'attire pas beaucoup de leucocytes; de plus les cultures passées à travers le filtre Chamberland ont à peu près les mêmes propriétés attractives vis-à-vis des leucocytes que les cultures fraîches et non filtrées. En me basant sur ces considérations, je partage complètement l'avis de MM. Massart et Bordet qui expliquent ces faits par la chimiotaxie des leucocytes : au moins cette chimiotaxie explique complètement les résultats principaux de mes observations.

En comparant le nombre de leucocytes qu'on trouve dans les tubes, dans les mêmes conditions, chez la grenouille et chez le lapin, on remarque qu'il y en a au moins dix fois plus chez ce dernier animal que chez le premier.

On ne sera pas étonné de cette différence si on considère que chez le lapin les tubes sont introduits dans le tissu cellulaire de l'oreille, tandis que chez la grenouille ils sont placés dans le sac lymphatique; que la température du lapin est bien supérieure à celle de la grenouille, et que les propriétés chimiotactiques des leucocytes sont différentes chez les deux animaux.

MM. Massart et Bordet n'ont expérimenté que sur les grenouilles. J'ai élargi leurs observations, en opérant sur les larves d'axolots et sur le lapin, qui m'a paru le plus commode des animaux à sang chaud pour ces observations. Il faut, en effet, arriver à l'étude des propriétés chimiotactiques spéciales à chaque espèce et même à chaque individu. Il sera surtout intéressant d'étudier les mouvements des leucocytes provoqués par l'introduction dans le corps des microbes de maladies contagieuses; on sait que le caractère individuel de la résistance à l'infection se manifeste d'une manière très prononcée. Je pourrais citer ici plus d'un fait emprunté à l'ouvrage de M. Steinhäus¹. Cet auteur remarque par exemple qu'en présence des

1. *Die Aetiologie der acuten Eiterungen*. Leipzig, 1889.

mêmes bactéries et des mêmes excitants chimiques, il se produit chez certains animaux beaucoup de pus, tandis qu'il ne s'en forme pas chez d'autres. Ainsi, l'essence de térébenthine introduite sous la peau des chiens et des chats provoque toujours la suppuration de phlegmons non microbiens; chez les cobayes et chez les lapins, la même substance employée en petite quantité (0,2 — 0,5 c. c.) se résorbait sans laisser des traces; injectée en quantité plus grande, elle provoquait l'œdème et une inflammation sérofibrineuse. Introduits sous la peau du lapin, les *Staphylococcus pyogenes aureus* et *albus* ne produisent aucune inflammation, tandis que les mêmes quantités de ces cultures provoquent chez les chiens et les chats une suppuration considérable; chez le cobaye elles occasionnent la formation de foyers purulents délimités, et chez les souris ces mêmes microbes ne produisent aucun trouble. Avec les cultures stérilisées, on provoquait en général des abcès chez les chiens et les chats; chez les lapins et les cobayes les mêmes quantités étaient résorbées sans aucune réaction. Introduites dans des tubes de verre, ces mêmes cultures occasionnèrent la formation de pus qui s'accumulait en forme de bouchon près de l'ouverture du tube ¹.

Tous ces faits peuvent être expliqués par les propriétés chimiotactiques des leucocytes. L'étude de ces propriétés pourra éclaircir les plus grandes questions de la pathologie, comme l'inflammation, l'immunité vis-à-vis des maladies contagieuses, et d'autres encore.

Mais en voilà assez quant à l'action des produits bactériens sur les leucocytes, je reviens à l'examen de mes expériences. J'ai étudié la chimiotaxie des leucocytes par rapport à un certain nombre de substances organiques et inorganiques. En général, cette chimiotaxie est beaucoup plus marquée vis-à-vis des substances organiques, ce qui est conforme aux observations précitées. Or, si nous convenons de regarder comme exerçant une chimiotaxie négative les substances qui n'ont attiré dans les tubes que peu de leucocytes, de sorte qu'on les compte par unités seulement chez la grenouille et par dizaines chez le lapin; si nous attribuons de même la chimiotaxie indifférente aux produits qui attirent les leucocytes par dizaines chez la gre-

1. *Wratksch*, n° 40, 1890, p. 239-240.

nouille et par centaines chez le lapin ; et la chimiotaxie positive à celles qui attirent un nombre de leucocytes dépassant ces derniers chiffres, les liquides que nous avons étudiés peuvent être divisés en trois grands groupes :

I. — *Principales substances à chimiotaxie négative.* Ce groupe comprend :

(a) solutions concentrées (10 %) de sels de sodium et de potassium.

(b) acide lactique de toutes les concentrations (10 à 0,1 %).

(c) quinine (0,5 %).

(d) alcool (10 %).

(e) chloroforme en dissolution aqueuse.

(f) jéquirity (2 %).

(g) glycérine (10 à 1 %).

(h) bile.

(i) *Bacilli cholerae gallinarum*.

II. — *Substances à chimiotaxie indifférente :*

(a) eau distillée.

(b) solutions moyennes et faibles de sels de sodium et de potassium (1 à 0,1 %).

(c) acide phénique.

(d) antipyrine (1 %).

(e) phloridzine (1 %).

(f) papayotine (1 %), pour la grenouille.

(g) glycogène (1 %).

(h) peptone (1 %).

(i) bouillon.

(j) sang, humeur aqueuse.

(k) poudre de carmin en suspension dans l'eau.

III. — *Substances à chimiotaxie positive :*

(a) papayotine (1/0/0), pour le lapin.

(b) cultures stérilisées et non stérilisées de microbes pathogènes et non pathogènes : *bac. anthracis* et son premier vaccin.

Dans le premier groupe nous rencontrons les composés chimiques qu'on appelle poisons protoplasmiques, par exemple la quinine et le chloroforme. Les solutions concentrées de sels

divers, l'acide lactique et la glycérine déterminent la plasmolyse dans le sens de la théorie de M. Massart. Enfin, tout à fait à part, il faut placer le jéquirity, substance extrêmement intéressante pour les bactériologistes et qui a été déjà beaucoup étudiée¹. Certains savants attribuent les phénomènes inflammatoires de la conjonctive, provoqués par le jéquirity, à un bacille spécial (Sattler, Cornil); d'autres à un poison spécial, la jéquiritine (MM. Bordet, Widmart, Neisser, Klein, Christmas et autres). Avec une macération aqueuse non stérilisée de graines d'*abrus precatorius*, on comptera les leucocytes par masses dans les tubes. Si l'on fait une injection avec cette infusion sous la peau de la grenouille, cette dernière succombe après quelques jours (3 à 6), et on trouve toujours une masse de bactéries dans son sang. En me servant, pendant mes expériences, de la même macération, en la faisant passer préalablement à travers le filtre Chamberland, je ne trouvais que très peu de leucocytes dans les tubes, et la quantité de macération de jéquirity capable de tuer les grenouilles ne les fait plus périr quand elle a été filtrée sur porcelaine. Il faut donc admettre que la filtration retient la majeure partie du principe actif. Il en reste cependant assez dans le liquide filtré pour que celui-ci manifeste la chimiotaxie négative. M. Christmas pense qu'après le passage à travers la porcelaine, la macération ne contient plus de jéquiritine.

Enfin, à propos de la dernière substance de ce groupe qui (d'après mes observations) a montré la chimiotaxie négative, à savoir la culture du *bacillus cholerae gallinarum*, je dois faire remarquer que seules les cultures fraîches (de 24 heures) de ce microbe manifestent nettement chez les lapins la chimiotaxie négative. Avec les cultures plus vieilles, on obtient des résultats indéterminés. Enfin, ainsi qu'il résulte des nos 108, 110, 126 et 127, les cultures stérilisées attirent plus de leucocytes que les cultures non stérilisées.

Quant au deuxième groupe, il comprend également les substances nutritives (sels, peptone, bouillon et, en général, liquides albumineux). Peut-être paraîtra-t-il étrange de voir dans ce groupe l'acide phénique et l'antipyrine. Mais il ne faut pas oublier que la dilution de la solution près du bout ouvert du tube peut

1. M. Salomonsen a déjà exprimé l'opinion que la jéquiritine peut exercer une influence spéciale sur les leucocytes.

produire, par suite de la diffusion, un changement dans les conditions de l'expérience.

D'après les recherches de MM. *Minkowski*, *Mering* et *H. Léo*, la phloridzine administrée à des animaux provoque chez eux le diabète. *M. H. Léo* a trouvé que le diabète, provoqué de cette manière chez les souris blanches, les rend sensibles à la morve¹. D'après mes observations, la phloridzine jouit de la chimiotaxie indifférente chez les grenouilles, les lapins et les souris blanches.

Le troisième groupe présente l'intérêt le plus grand. Si l'on en excepte les cultures de *bacilli chol. gall.*, toutes les autres cultures des bactéries attirent de telles quantités de leucocytes qu'il se produit des embolies pyohémiques dans les tubes. Lorsque, dans les liquides du premier et du second groupe, il se développait accidentellement des bactéries, le nombre de leucocytes augmentait alors considérablement, et même chez les grenouilles il se produisait une embolie pyohémique. On peut donc dire que les microbes sont des excitants spécifiques des leucocytes, et que ceux-ci se laissent attirer à distance par les quantités très petites de produits élaborés par les bactéries. On conçoit que les différents microbes connus possèdent à des degrés divers la chimiotaxie négative ou positive, et les recherches futures devront indiquer les relations des leucocytes non seulement avec les diverses espèces de microbes, mais aussi avec les produits qu'ils préparent et qui aujourd'hui jouent un rôle important dans la question de l'immunité et dans la symptomatologie des maladies contagieuses. Il faut encore beaucoup de recherches pour élucider les questions soulevées dans ces dernières années, à propos des propriétés chimiotactiques des leucocytes. Mais, dès maintenant, il y a tout lieu de croire que ces recherches éclaireront plus d'un des côtés obscurs des phénomènes physiologiques et pathologiques auxquels les leucocytes participent. J'estimerai que ce mémoire a atteint son but si j'ai réussi à montrer que les propriétés chimiotactiques des leucocytes du lapin (animal à sang chaud) se manifestent plus énergiquement que celles des cellules blanches de la grenouille, et qu'il y a des microbes (*Bacilli chol. gall.*) et aussi certaines substances organiques et inorganiques (jéquirity, acide lactique, etc.) qui possèdent la chimiotaxie négative.

1. Beiträge zur Immunitätslehre. *Zeitsch. f. Hygiene*, I, VII, 1889.

TABLEAUX D'EXPÉRIENCES.

| GRENOUILLE | | | | LAPIN | | |
|--------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---|--------------------------|----------------------------|--------------|
| NUMÉRO DE L'EXPÉR. | LE LIQUIDE EMPLOYÉ | NOMBRE DES LEUCOCYT. | OBSERVATIONS | NUMÉRO DE L'EXPÉR. | NOMBRE DES LEUCOCYT. | OBSERVATIONS |
| 1 | Eau distillée..... | 0 à 00 | | 2 | 00 | |
| 3 | Chlorure de sodium, à 10 ‰ | 0 | | 4 | 00 | |
| 5 | — à 1 ‰ | 00 | | 6 | 000 | |
| 7 | — à 0,1 ‰ | 00 | | 8 | 00 | |
| 9 | Chlorure de potassium, à 10 ‰ | — | | 10 | 00 | |
| 11 | — à 1 ‰ | 00 | | 12 | 000 | |
| 13 | — à 0,1 ‰ | 00 | | 14 | 00 | |
| 15 | Carbonate de soude, à 1 ‰ | 0 | | | | |
| 16 | — à 0,1 ‰ | 0 | | | | |
| 17 | Carbonate de potasse, à 1 ‰ | 0 | | | | |
| | — à 0,1 ‰ | 0 | | | | |
| 18 | Bicarbonate de soude, à 10 ‰ | 0 | | 19 | 000 | |
| 20 | — à 1 ‰ | 00 | | 21 | 000 | |
| 22 | — à 0,1 ‰ | 00 | | 23 | 000 | |
| 24 | Lactate de fer, à 1 ‰ | 0 | | | | |
| 25 | — 0,1 ‰ | 0 | | | | |
| 26 | Ac. lactique, à 10 ‰ | — | | 27 | — | |
| 28 | — à 1 ‰ | 0 | | 29 | 00 | |
| 30 | — à 0,1 ‰ | 0 | | 31 | 00 | |
| 32 | Acide phénique, à 5 ‰ | 0 à 00 | | 33 | 00 | |
| 34 | Antipyrine, à 1 ‰ | 00 | | 35 | 00 | |
| 36 | Chlorhydrate de quinine, à 0,5 ‰ | — | | 37 | 0 | |
| 38 | — à 0,1 ‰ | 00 | | 39 | 00 | |
| 40 | Alcool, à 10 ‰ | 0 | | | | |
| 41 | — 1 ‰ | 00 | | | | |
| 42 | Chloroforme, solut. aq. | — | | 43 | 0 | |
| 44 | Phloridzine, solut. aq. | 00 | | 45 | 000 | |
| 46 | — 0,25 ‰ dans l'alcool à 10 ‰ | 0 | | | | |
| 47 | Papayotine, 1 ‰ | 00 | Filtrés par le | 48 | 0000 | |
| 49 | Jéquirity, 2 ‰ | 0 | filtre Chamber- | 50 | 00 | |
| 51 | Glycérine, 10 ‰ | — | land. | | | |
| 52 | — 1 ‰ | 0 | | | | |
| 53 | Gomme arabique, 1 ‰ | — | Dans un autre tube dans lequel se sont dévelop- pées des bacté- ries, nombre des leucocytes : 000. | | | |
| 54 | Glycogène, 1 ‰ | 00 | | | | |
| 55 | Hémoglobine, 1 ‰ | 0 | | | | |
| 56 | Peptone, 1 ‰ | 00 | | 57 | 000 | |
| 58 | Peptone putréfiée | 0000 | | | | |
| 59 | La même stérilisée | — | | | | |
| 60 | Bouillon de veau | 00 | | | | |

| GRENOUILLE | | | | LAPIN | | |
|--------------------------|---|----------------------------|--|--------------------------|----------------------------|--------------|
| NUMÉRO DE L'EXPÉR. | LE LIQUIDE EMPLOYÉ | NOMBRE DES LEUCOCYT. | OBSERVATIONS | NUMÉRO DE L'EXPÉR. | NOMBRE DES LEUCOCYT. | OBSERVATIONS |
| 61 | Macération de foie de lapin..... | 0 | | 62 | 000 | |
| 63 | Macération de la rate du même animal..... | 00 | | 64 | 0000 | |
| 65 | Macération du rein... | 00 | | 66 | 000 | |
| 67 | Macération du poumon. | 00 | | 68 | 000 | |
| 69 | Sang de lapin..... | | | | 000 | |
| 70 | Bile de lapin..... | | | | 00 | |
| 71 | Urine..... | | | | 00 | |
| 72 | Humeur aqueuse..... | | | | 000 | |
| 73 | Poudre de carmin dans de l'eau..... | 00 | | 74 | 000 | |
| 75 | Bleu de méthylène, 4 %. | — | | | | |
| 76 | Eosine, solut. aq. 1 %. | 00 | | 78 | 0000 | |
| 77 | Bacillus anthracis..... | 00 | | 80 | 000 | |
| 79 | Bac. anthr. 1 ^{er} vaccin.. | 00 | | 82 | 000 | |
| 81 | Le même stérilisé..... | 00 | | | | |
| 83 | Bacille pyocyanique, culture âgée de 24 heures. | 000 | | | | |
| 84 | Bacille pyoc. de 8 jours. | 00000 | | | | |
| 85 | — de 21 jours. | 0000 | | | | |
| 86 | — de 1 jour.. | 00 | | | | |
| 87 | — de 8 jours. | 000 | | | | |
| 88 | — de 3 sem.. | 0000 | | | | |
| 89 | — de 5 sem.. | 0000 | | | | |
| 90 | — de 6 sem.. | 00 | | 91 | 000 | |
| 92 | — culture stérilisée à 120°..... | 0 | | 93 | 000 | |
| 94 | Bacille pyocyan. culture filtrée sur le filtre Chamberland..... | 00 | | 95 | 000 | |
| 96 | Bacille pyocyanique culture âgée de 10 jours. | 000 | | 97 | 0000 | |
| 98 | Bacille stérilisé à 120°.. | 00 | | 99 | 0000 | |
| 100 | — filtrée..... | 000 | | 101 | 0000 | |
| 102 | Bac. pyoc. culture 5 sem. | 000 | | | | |
| 103 | La même avec de l'eau chloroformée..... | 00 | | | | |
| 104 | La même avec quinine, à 5 %. | 00 | | | | |
| 105 | Bac. pyocyan., culture. | 0000 | Grenouille laissée dans la chambre. | | | |
| 106 | La même..... | 000 | Grenouille à l'étuve à 32-34°. | | | |
| 107 | La même..... | 00 | Grenouille anesthésiée par le chloroforme. | | | |
| 108 | Bacille du choléra de poules..... | 0 | | 109 | 00 | |
| 110 | Le même, stérilisé 120°. | 00 | | 111 | 000 | |
| 112 | Bac. du typhus abdom. | 0000 | | 113 | 00000 | |
| 114 | Staphyl. pyog. albus... | 000 | Les cultures stérilisées ont donné le même résultat. | 115 | 0000 | |
| 116 | Bacillus prodigiosus ... | 000 | | 117 | 0000 | |
| 118 | Bac. du rouget de porcs. | 00 | | 119 | 0000 | |
| 120 | Le même..... | 00 | | 121 | 0000 | |

LARVES D'AXOLOTLIS BLANCS

| NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE | LIQUIDE EMPLOYÉ | NOMBRE DES LEUCOCYTES | OBSERVATIONS |
|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|
| 422 | Bacille pyocyanique..... | 0000 | Le tube a été retiré 48 heures après son introduction. |
| 423 | Chlorhydrate de quinine à 0,5 %. | — | |
| 424 | Papayotine à 1 %..... | 000 | Filtrés sur le fil- tre Chamberland. |
| 425 | Jéquirity à 2 %..... | 00 | |
| 426 | Bacille du choléra des poules..... | 00 | Tube retiré après 24 heures. |
| 427 | Le même stérilisé..... | 000 | |

Ce travail a été fait à l'Institut Pasteur, sous la direction de M. Metchnikoff, à qui je ne puis m'empêcher d'exprimer ici ma reconnaissance pour les conseils qu'il a bien voulu me donner.

RECHERCHES SUR L'ADAPTATION AU MILIEU

CHEZ LES INFUSOIRES ET LES BACTÉRIES

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ

PAR W.-M. HAFKINE.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur.)

L'action toxique qu'exercent sur les microbes qu'on y introduit certains liquides normaux et pathologiques de l'organisme a été beaucoup étudiée dans ces derniers temps, et a fourni matière à des assertions très contradictoires. Que ces phénomènes aient un degré de contingence que ne leur avaient pas soupçonné les premiers qui les ont étudiés, c'est ce dont on ne peut plus douter aujourd'hui. En dehors des causes d'erreur qui peuvent conduire à considérer comme tué par son contact avec un liquide organique un microbe simplement un peu affaibli, mais encore très vivant, on a vu qu'une même espèce microbienne pouvait se comporter tout différemment dans le même milieu, suivant que sa semence provenait de telle ou telle origine. Le microbe manifeste là comme sur d'autres points des qualités héréditaires, et M. Metchnikoff insistait tout récemment dans ces *Annales* (t. III, p. 664) sur l'influence que pouvait exercer, sur la vitalité du microbe, sa non adaptation préalable au milieu dans lequel on l'introduit. Je me suis proposé de chercher quelle est l'étendue du rôle que peut jouer cette adaptation préalable dans les phénomènes en question.

Mais j'ai cru devoir sortir pour cela, au moins en commençant mon étude, du monde des microbes, et m'adresser aux infusoires vivant dans l'eau. On a l'avantage d'avoir affaire à des espèces plus grosses, où les genres et même les individus

sont plus facilement reconnaissables, et dont l'étude est à la fois plus prompte et plus précise. En outre leur liquide nourricier est de constitution plus simple, plus facile à définir que celle des bouillons ou des humeurs de l'organisme; il y avait chance de pouvoir mettre en relation plus étroite les variations de composition du milieu et les variations de résistance de l'être. On pouvait seulement se demander si on retrouvait dans ces conditions d'habitat une sensibilité au milieu comparable à celle des microbes. On va voir que les infusoires de l'eau ne laissent rien à désirer à cet égard.

I

J'ai recueilli, au mois de novembre de l'an dernier, des eaux sur divers points de Paris, et je les ai examinées, après quelques jours de séjour au laboratoire, au point de vue des infusoires qu'elles renfermaient. A ce moment de l'année, la population de protozoaires n'est pas riche, mais elle s'est montrée suffisante pour le but que j'avais en vue.

L'une de ces eaux s'est révélée tout de suite comme nettement distincte des autres, elle contenait : un plasmodium voisin du *Mastigamæba aspera* de Schultze, mais sans flagellum et sans aspérités; plusieurs espèces de diatomées, l'*Anomænis* entre autres; une espèce d'algues palmellacées; une oscillaire; une espèce de Bodons; une *Aspidisca* et l'*Euplotes patella* de Ehrenberg. Le liquide paraissait pauvre en matières organiques, restait parfaitement limpide pendant toute la durée de l'observation, et avait une réaction neutre.

J'ai étudié les résultats du mélange de ce liquide naturel, avec une infusion artificielle faite en laissant séjourner, dans de l'eau, de la vase et des feuilles mortes ramassées au fond des bassins de la cour du Conservatoire des arts et métiers. Cette infusion contenait un mélange de *Paramecium aurelia* et de *Paramecium bursaria*, incolores ou envahis par des zoochlorelles; de *Microthorax*, de *Coleps*, de *Chilomonas*, de *Colpoda*, d'une oxytriche, d'une anguillule et d'un petit rotifère que je n'ai pas déterminés plus exactement.

En mélangeant une gouttelette du premier liquide à une petite quantité du second, on la voyait tuer à l'instant tous les

habitants de l'infusion qui se trouvaient à sa portée ; mais ses propres habitants n'échappaient pas : Aspidisques et Euplotes périssaient aussi, et le mélange était dépeuplé au bout de quelques instants comme il l'aurait été par un puissant antiseptique.

Pour scruter le phénomène de plus près, je plaçais l'une vis-à-vis de l'autre, sur les pentes de la concavité d'un verre de montre, les deux gouttelettes à mélanger, et je les réunissais par un petit pont de liquide : les deux gouttes, en glissant vers le fond du verre, y confondaient graduellement leurs matières en solution et leurs habitants.

J'ai pu ainsi constater facilement les faits suivants :

Quand on mélange des parties égales des deux liquides, ce sont les habitants de l'infusion artificielle qui périssent les premiers : d'abord les Coleps, puis les petits Rotifères, puis le *Par. aurelia*, le *Par. bursaria*, le *Microthorax*, etc. Les habitants de l'eau naturelle résistaient mieux : on les voyait vivants et mobiles longtemps après que toute l'autre population était morte et déformée.

En faisant varier la grosseur relative des gouttelettes à mélanger, j'ai vu qu'il fallait mettre environ deux fois à deux fois et demi plus de l'infusion que de l'eau naturelle pour que les populations des deux gouttelettes périssent avec la même rapidité. En prenant pour terme de comparaison cette action réciproque, l'une des deux liqueurs se montrait donc environ deux fois plus active que l'autre.

Les changements qu'amenait le mélange sur chacun des groupes d'organismes avaient ceci comme caractère distinctif que les habitants de l'eau naturelle mouraient avec un fort gonflement du corps, et finissaient par être déformés et déchirés ; les habitants de l'infusion subissaient une forte contraction qui les rendait, au début, hyalins et presque gélatineux ; puis, plus tard, ils devenaient granuleux et opaques ¹.

A quoi tenait cette inégalité et cette diversité d'action ? Pour voir si la concentration des liqueurs y jouait un rôle, j'ai laissé se dessécher, à côté l'une de l'autre, sur un porte-objet, deux gouttes égales des deux liquides ; celui qui contenait les Euplotes laissa une trace beaucoup plus épaisse que celui qui

1. Voir des observations analogues dans le travail de M. Massart, *Archives de biologie*, t. IX, 1889.

contenait les Paramécies. Sur cette dernière trace, j'ai successivement ajouté et laissé se dessécher des gouttes égales à la première, jusqu'à obtenir un dépôt aussi abondant que celui de la goutte unique de l'eau étudiée. J'ai ainsi constaté que cette eau, qui exerçait une si forte action destructive sur les habitants de l'infusion et aussi sur ceux d'un grand nombre d'autres cultures, était environ dix fois plus concentrée que l'infusion artificielle contenant les Paramécies.

Il pouvait donc y avoir une influence de cette concentration, mais il pouvait y avoir aussi, dans l'une des deux liqueurs ou dans les deux, quelque substance particulièrement nocive pour les organismes de l'autre culture.

Ce dilemme était facile à résoudre de suite pour le liquide le moins concentré. Il suffisait de le ramener par une évaporation spontanée, à la densité de l'autre, et d'y apporter les habitants de l'autre culture. Ils devaient y persister, si c'était simplement une question de concentration qui était en jeu. Si au contraire l'effet était dû à une substance nuisible, la concentration devait avoir augmenté la puissance destructive de la liqueur. Or, c'est ce second cas qui s'est produit.

Cette méthode ne s'appliquait pas à l'examen de la solution la plus dense, que la dilution nécessaire pour l'amener au niveau de l'autre, aurait appauvrie de sa substance nuisible, au cas où il y en aurait eu une. Mais on pouvait concentrer au dixième de son volume le liquide le moins dense contenant les Paramécies, et y transporter ensuite une colonie de ces petits êtres. L'expérience faite montre qu'après une courte période d'agitation et de surprise, ces infusoires y reprennent leur train habituel et leur vie normale. Ce n'était donc pas une question de concentration qui était en jeu.

Nous avions alors devant nous deux échantillons d'eau douce, tous deux habités par une population composée d'espèces les plus ordinaires et les plus répandues, et qui avaient l'une sur l'autre une action microbicide des plus intenses, s'exerçant non pas avec le concours du temps sur des cultures dont elle entrave peu à peu le développement, mais produisant son effet en quelques instants, et d'une manière qualitativement différente, autant qu'on en pouvait juger par les expériences ci-dessus.

Cette exclusion mutuelle des deux populations dans le mélange était-elle absolue, comme tenant à une incompatibilité foncière des espèces en présence, ou bien dépendait-elle de particularités acquises, et par là, modifiables chez ces espèces ? En d'autres termes, pouvait-on arriver, avec quelques soins et quelques précautions, à faire vivre en commun, et dans les mêmes milieux, ces Paramécies de l'infusion et ces Euplotes de l'eau naturelle qui, puisées chacune dans son propre milieu, s'excluaient mutuellement quand on mélangeait leurs liquides nutritifs ? Telle est la question que nous avons cherché à résoudre par les expériences suivantes.

II

Dans une eau contenue dans les caniveaux entourant les plates-bandes du Jardin des Plantes, eau que je dois à l'obligeante intervention de M. le professeur Cornu, j'ai trouvé une riche population faite surtout d'organismes verts, Euglènes, Chlamidomonades, Phacus, au milieu desquels pullulaient une foule de Chilomonades, d'Euplotes, de Vorticelles, de Bodons et de Chytridiens inférieurs.

Au regard des deux liquides étudiés plus haut, cette eau présentait cette particularité que l'*Euplote* s'y trouvait associé avec ce même *Chilomonas paramecium*, qui, dans les infusions ci-dessus, vivait avec la Paramécie, et souffrait si fort du contact du liquide à Euplotes. Ce *Chilomonas paramecium* est du reste connu comme un habitant ordinaire des infusions à paramécies. D'un autre côté l'un des meilleurs moyens que j'aie trouvés, à Odessa, pour cultiver les paramécies, a été de les placer dans des liquides riches en Chlamidomonades, où les paramécies se nourrissaient de leurs formes végétatives.

Cela posé, pour établir d'une façon tout à fait concrète ce qu'il y a de mutabilité dans les relations biologiques des infusoires étudiés, je me suis proposé de préparer trois liquides, l'un dans lequel deux des espèces ci-dessus pourraient vivre et prospérer ensemble, les deux autres capables chacun de détruire l'une de ces espèces et de laisser le champ libre à l'autre.

Au lieu d'opérer avec la Paramécie et l'*Euplotes* qui, dès l'origine, habitaient des milieux mutuellement hostiles, je me

suis adressé pour commencer au *Chilomonas* et à la *Paramécie*, qui paraissaient être très facilement commensales. Le milieu qui les nourrissait toutes deux était précisément le liquide où je les avais trouvées réunies. Pour exclure le *Chilomonas* sans entraver en rien le développement de la *Paramécie*, il m'a suffi d'ajouter 1/300 de carbonate de potasse à l'infusion de vase et de feuilles mortes dont j'ai parlé plus haut. En ajoutant au contraire à cette infusion 1/1200 à 1/1600 d'acide sulfurique, on éliminait la *Paramécie* en laissant prospérer les *Chilomonades*.

Ce sont là des faits analogues à ceux qu'on a souvent observés sur les bactéries ; mais en entrant dans le détail, nous allons rencontrer des particularités curieuses. Nous pouvons distinguer chez nos infusoires deux facultés différentes, celle de supporter le premier choc, la première impression du liquide où on les introduit, et celle de proliférer dans ce nouveau milieu. Ces deux facultés sont loin d'aller de pair et on peut, en variant les conditions d'expérimentation, les voir produire les résultats les plus divers.

Une espèce de *Loxocephalus*, dont l'extrémité antérieure est couverte de longs cils épars, et auquel j'ai donné le nom de *Loxocephalus hirsutus*, prise dans son milieu naturel, et transportée dans l'eau alcalinisée par du carbonate de potasse, la supporte beaucoup plus péniblement que le *Paramecium* ; en solution acide, c'est le contraire qui a lieu. Cette fois, la faculté de résister au premier contact va de pair avec la faculté de multiplication : ce *Loxocephalus* se multiplie plus facilement dans les milieux acides que dans les milieux alcalins.

Mais le petit *Chilomonas paramecium* se montre plus fragile que le *Paramecium aurelia* non seulement au contact avec un milieu alcalin, mais aussi dans un milieu acide ; cependant, tandis que dans ce dernier il ne tarde pas à prendre le dessus, et que ceux qui ont supporté le premier choc se développent avec une énorme abondance, alors que le *P. aurelia* disparaît, dans un milieu alcalin c'est le contraire qui a lieu. Tout ceci dans le cas où les deux infusoires sont puisés dans leur milieu naturel neutre, car nous verrons tout à l'heure l'influence de la question d'origine.

Si nous comparons maintenant avec le *P. aurelia* et le *Chilomonas paramecium* le *Coleps hirtus*, petit cilié bien connu comme l'hôte habituel des eaux douces et des aquariums de laboratoire, nous le verrons se comporter comme ceci. En alcali-

nisant le liquide au point de tuer les Chilomonades et les Paramécies, une foule de Coleps restent vivants et ne disparaissent que quelques heures plus tard. Mais si on s'arrête dans l'alcalinisation au moment où la dose laisse encore vivre un nombre considérable de *Paramecium*, les Coleps finiront par disparaître tout de même, les Chilomonades aussi, tandis que les Paramécies qui ont résisté au premier choc, recommencent à se multiplier et finissent par peupler la liqueur.

De même le *Loxocephalus*, par comparaison avec le *Paramecium* et le *Chilomonas*, présente cette particularité qu'il résiste beaucoup mieux qu'eux à la première impression d'un liquide acidulé par l'acide sulfurique; mais cette fois, c'est le petit Chilomonas, le moins résistant, qui s'acclimata le plus facilement, et les individus de cette espèce qui ont survécu y donnent une culture très abondante, laissant loin derrière eux le *Loxocephalus*, tandis que le *P. aurelia* tend obstinément à disparaître. Ces exemples suffisent pour faire ressortir les différences dont nous parlions plus haut. Mais ces différences paraissent être en rapport avec la nature morphologique de l'infusoire, et avoir par là un caractère spécifique. Voyons si elles ont bien réellement ce caractère.

Une eau naturelle contenant des Chilomonades est alcalinisée jusqu'à un degré un peu inférieur à celui qui ferait périr cet infusoire. Dans mes expériences, on pouvait ajouter jusqu'à 4/15 0/0 de carbonate de potasse. Beaucoup de Chilomonades succombent de suite, et on peut ainsi en supprimer les 9/10 sans que l'expérience en souffre. On décante alors ce liquide, pour le séparer des cadavres des infusoires tués, ou bien on s'assure que ceux-ci ne sont pas seulement immobiles parce qu'ils ont perdu leurs filaments flagelliformes, mais présentent les désordres caractéristiques de la mort. En laissant cette culture alcalinisée à côté de l'eau naturelle, on verra au bout de 12 à 24 heures les Chilomonades s'y multiplier de nouveau et la peupler de leurs essaims.

Même résultat si on transporte les Chilomonades dans une solution à 1/12 0/0 d'acide sulfurique. Après avoir été fortement décimés au début, les individus qui ont survécu se multiplient d'autant plus facilement qu'ils ne rencontrent plus autour d'eux de concurrents et de rivaux.

C'est là un résultat analogue à celui qui a été obtenu par M. Nuttall, avec la bactériodie charbonneuse transportée dans du sang, et qui commence par y périr en grand nombre, avant de s'y multiplier. Mais l'expérience se fait ici dans des conditions plus simples, avec de l'eau, avec une substance minérale, le carbonate de potasse, sans rien de cette difficulté d'interprétation qu'y apportent le sang et les relations biologiques, immunité, réceptivité, virulence, atténuation, qu'on peut être tenté d'invoquer.

C'est ici un phénomène d'adaptation, et je pouvais dès lors songer à préparer un milieu tantôt favorable et tantôt hostile à une même espèce d'infusoires, la laissant tantôt prospérer et tantôt périr, suivant que l'adaptation de l'espèce aurait été dirigée dans un sens ou dans l'autre. Il suffisait d'agir sur la cellule vivante elle-même, et de lui créer, en agissant sur ses origines, une disposition, tantôt favorable, tantôt hostile aux conditions nouvelles dans lesquelles je voulais la placer.

Pour cela j'ai ajouté, à 2^{cc} d'un liquide à *Chilomonades*, 1/6 0/0 de carbonate de potasse cristallisé. Au bout de 3 jours, le *Chilomonas* pullulait dans le liquide, accompagné d'un certain nombre de *Paramecium bursaria* incolore, de Colpodes et de *Par. aurelia*. On a alors ajouté au liquide un petit grain de carbonate de potasse, de la grandeur d'une grosse tête d'épingle; puis, encore après 24 heures, deux grains de la même dimension; puis le lendemain encore un quatrième grain. Vingt heures après, je n'ai retrouvé dans le liquide que trois individus de *Par. aurelia*, un seul de *Par. bursaria*, tandis que les *Chilomonades* étaient en foule. Avec cette culture, j'ai fait les expériences suivantes.

Dans l'infusion naturelle contenant le *Chilomonas paramecium* on a pris 1 centimètre cube de liquide, et on y a ajouté juste la quantité de carbonate de potasse nécessaire pour y tuer, par action brusque, toutes les *Chilomonades* et les *Par. aurelia* qui s'y trouvaient. On a filtré ce liquide sur du papier buvard, et on y a ajouté encore deux petits grains de carbonate.

On plaçait alors sur un porte-objet plat une grosse goutte de ce liquide, et à droite et à gauche de celle-ci deux gouttelettes, l'une de l'eau naturelle contenant une dizaine de *Chilomonades*, l'autre de la culture alcalinisée, contenant aussi des *Chilomonades*, dont je viens de parler. On réunissait par un petit pont de liquide les deux gouttelettes latérales avec la grosse, et on

observait sous le microscope. On voyait alors les Chilomonades alcalinisées entrer sans gêne aucune dans la goutte centrale et s'y promener comme si de rien n'était : au contraire, les Chilomonades de l'eau naturelle montraient la plus grande répugnance pour le liquide de la grosse goutte et s'obstinaient à ne pas y pénétrer. Le courant de diffusion les y entraînait pourtant, et on voyait alors les infusoires, après deux ou trois bonds brusques et anormaux, perdre leurs cils, tomber immobiles au fond de la goutte. Leur corps protoplasmique, d'abord contracté, se gonflait bientôt, les parois extérieures se déchiraient, et le contenu disparaissait dans le liquide ambiant, ne laissant qu'un petit tas granuleux comme souvenir de l'infusoire.

Cette expérience peut prendre une autre forme. J'ai juxtaposé, sur un porte-objet, une goutte de la culture alcalinisée, et une gouttelette de l'eau naturelle. Dans toutes les deux, il y avait des Chilomonades en pleine prospérité. Il suffisait alors de réunir la grosse goutte avec la petite pour voir celle-ci perdre en un temps très court tous ses habitants. Enfin, une troisième expérience, faite avec la même culture, a consisté à placer au milieu de ces Chilomonades un *Paramecium aurelia* retiré de sa culture naturelle, et à observer comment il se comporte. Cet infusoire, que nous avons vu résister à l'influence brusque d'une solution à $1/3$ 0/0 de réactif, pendant que les Chilomonades disparaissaient, périt subitement ici, dans une solution plus concentrée de carbonate, pendant que les Chilomonades continuent à y vivre avec une insouciance complète.

En terminant l'exposé de cette série d'expériences, je dois en citer encore une qui montre la différence entre diverses espèces d'infusoires au point de vue de la mutabilité de leurs caractères biologiques. A une solution contenant des Paramécies et des Chilomonades, on ajoute de $4/15$ à $1/5$ 0/0 de carbonate de potasse. Nous savons déjà qu'il suffirait d'en ajouter $1/15$ ou $2/15$ en plus pour éliminer toutes les Chilomonades et avoir une culture pure de Paramécies. Au lieu de procéder ainsi, on laisse la goutte se concentrer par évaporation lente à la température de la chambre, en la couvrant à peine par un morceau de verre ou de carton. La concentration va beaucoup au-dessus de la limite indiquée, et on observera comme résultat non pas la disparition des Chilomonades, mais celle des Paramécies. La petite Chilo-

monade, dont la multiplication est beaucoup plus rapide, devancera la grosse Paramécie dans le processus d'adaptation au changement de milieu.

III

J'arrive maintenant aux bactéries pathogènes. Au début, mes expériences sur elles ont été faites en isolant dans des gouttes pendantes, faites avec une des humeurs de l'organisme, un nombre très restreint de microbes, d'ordinaire de 1 à 6 par goutte. Toutes les précautions étaient prises pour conserver aux humeurs leurs propriétés normales. L'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'œil étaitensemencée aussitôt extraite. À l'origine, l'extraction et l'ensemencement se faisaient même dans l'étuve, à 36°, pour éviter le moindre refroidissement. Plus tard, on a renoncé à cette précaution comme sans influence sur le résultat. Pour obtenir le sérum, on ne laissait le sang au froid que 24 ou 48 heures au plus.

Mes premiers essais ont été faits avec la bactéridie charbonneuse, mais j'ai vu tout de suite apparaître des irrégularités dont j'étais impuissant à préciser la cause. Il m'arrivait de voir quelquefois la grande majorité ou même la totalité des cellules ensemencées donner les plus belles cultures, et d'autres fois toutes rester stériles.

Ainsi, sur 20 gouttes d'humeur aqueuse de lapin, ensemencées le 10 février 1890 avec des bactéridies retirées le même jour d'un cobaye charbonneux, 4 se sont desséchées, et les autres se sont richement peuplées. En ensemençant le même jour, avec la même bactéridie, 12 gouttes de l'humeur aqueuse d'un chien, *inoculé pour la seconde fois le même jour par le charbon, et qui a succombé plus tard à l'infection charbonneuse*, je n'ai eu aucun développement.

Le lendemain, j'ai ensemencé 32 gouttes de l'humeur aqueuse d'un chien qui *inoculé aussi, a survécu à l'infection charbonneuse*, avec des bactéridies retirées de la chambre antérieure de l'œil d'un rat charbonneux; 3 de ces gouttes ont souffert de la dessiccation; sur les 29 autres, trois n'ont rien donné; dans les 26 dernières il y a eu un très riche développement.

Le lendemain, des bactéridies retirées du sang d'un cobaye

ont étéensemencées dans l'humeur aqueuse d'un chien neuf, et réparties en 30 chambres humides. Dans toutes, les bâtonnets, après s'être allongés dans les 2 à 5 premières heures, de façon à devenir environ 20 fois plus grands, se sont arrêtés là, et n'ont pas poussé davantage pendant les 24 heures qu'a duré l'observation.

Le 13 février, on a extrait, dans l'étuve à 35°, l'humeur aqueuse d'un chien et on l'a répartie dans deux tubes à essais dont l'un,ensemencé avec des bactéridies retirées le même jour d'un pigeon charbonneux, a servi à faire l'ensemencement de 34 gouttes suspendues faites avec le contenu de l'autre tube. Cinq de ces gouttes sont restées stériles; les autres ont donné une végétation très abondante.

Le lendemain on a fait la même opération avec deux tubes à essai contenant l'humeur aqueuse d'un lapin neuf, et deux autres contenant l'humeur aqueuse d'un lapin vacciné contre le charbon. Dans aucun de ces tubes, il n'y a eu de culture.

Des faits de cette nature ont souvent été observés, et ne sont toujours pas faciles à expliquer. Les qualités propres du microbe y jouent un rôle décisif, et nous allons retrouver bientôt cette face de la question. Mais il y a aussi des causes d'erreurs expérimentales, que j'ai visées en commençant cet article, et sur lesquelles je voudrais insister un moment, avant de revenir à la biologie des microbes.

Une cause d'erreur, méconnue jusqu'ici, résulte de l'expérience suivante. Deux tubes à essais identiques, renfermant chacun de l'humeur aqueuse de lapin, l'un chauffé une heure à 55°, l'autre resté le même temps à l'étuve à 32°, ont étéensemencés avec une gouttelette de sang de cobaye charbonneux qui leur a communiqué une faible teinte rose, puis laissés en repos. Des prises d'essai, faites de temps en temps pendant les premières heures, ont montré que les bacilles restaient en suspension dans l'humeur chauffée et disparaissaient peu à peu dans l'autre, si bien qu'au bout de 4 heures on n'en trouvait plus. Comme l'humeur non chauffée était aussi moins rouge et moins trouble que l'autre, j'ai pensé que les bactéridies s'étaient déposées au fond avec les globules sanguins : aussi je l'ai agitée, et j'ai vu se détacher du fond des globules rouges, mais cette agitation n'a pas fait reparaitre les bactéridies dans le liquide.

Qu'avaient-elles pu devenir? Pour le savoir, j'aspirai dans des tubes capillaires de l'humeur aqueuse, chauffée ou non chauffée, etensemencée avec une petite gouttelette de sang charbonneux. De ces tubes, laissés en repos sur une table, on faisait sortir de temps en temps une gouttelette pour l'observation microscopique, et on a vu qu'avec l'humeur chauffée comme avec l'humeur non chauffée, le nombre des bactériidies qui sortaient avec la gouttelette allait en diminuant, et qu'il n'y en avait plus après 30 minutes ou une heure. Mais alors, en vidant le tube, en le remplissant ensuite d'une solution de bleu de méthylène, puis en le vidant à nouveau, on en voyait au microscope les parois tapissées par les bactériidies, qui y étaient restées adhérentes malgré les lavages réitérés du tube.

Il y a donc, s'exerçant sur la bactériдие, une de ces actions de parois dont il a été si souvent question dans ces *Annales*, et si on ne retrouvait plus, avec les tubes capillaires, la différence entre l'humeur aqueuse chauffée et non chauffée que nous avons observée dans les tubes à essai, c'est sans doute que cette action de parois, prédominante dans les tubes capillaires, avait effacé les différences, d'ordre plus faible, qui peuvent exister entre le liquide chauffé et non chauffé. Ceci m'a conduit à répéter l'expérience des tubes à essai avec 2 anneaux de verre qu'on transformait en cuvettes en les collant sur un porte-objet. Ces cuvettes, stérilisées, et remplies d'humeur aqueuse chauffée et non chauffée,ensemencée comme plus haut avec de la bactériдие charbonneuse, ont été abandonnées au repos, couvertes par une lamelle, de 3 heures et demie de l'après-midi à 10 heures du soir. On a pris alors, à la surface de chacune des deux, une gouttelette de liquide qu'on a étalée sur lamelle pour l'examen microscopique; on a ensuite aspiré le reste du liquide, qu'on a bien agité avant d'en faire une préparation. Enfin, on a détaché les deux anneaux de verre du porte-objet, et on a laissé ce dernier se dessécher. Puis toutes ces préparations, colorées au bleu de méthylène, ont été étudiées au microscope. Nulle part la bactériдие n'avait perdu l'état de bâtonnets courts, ce qui est très favorable à l'observation. Or, tandis qu'il était facile de retrouver des bacilles dans les prises faites à la surface et dans l'épaisseur de l'humeur chauffée, il n'y en avait pas dans les préparations faites avec l'humeur non chauffée. En revanche le fond de la cuve qui l'avait

contenue en montrait des couches serrées. M. Metchnikoff a bien voulu examiner lui-même toutes les préparations provenant de ces expériences, qui n'ont pas été poussées plus loin, mais qui suffisent à montrer que la bactériodie tombe plus facilement à travers l'humeur aqueuse chauffée que non chauffée, et que l'on a pu croire quelquefois légitimement à la mort de bactériodies qui étaient simplement adhérentes à la surface du verre, et ne se remettaient pas en suspension dans le liquide dans lequel on les recherchait.

Il est vrai que je n'ai pas retrouvé ces résultats avec le sérum du sang. Les bactériodies mortes et vivantes y restent en suspension et ne se collent pas aux parois. Notons que ce liquide est plus dense et plus visqueux que l'humeur aqueuse. Notons aussi que s'il s'agit d'actions de teinture et de mordantage, rien ne dit *a priori* que des bactériodies noyées dans du sérum doivent se comporter, vis-à-vis des surfaces de verre, comme des bactériodies recouvertes d'une couche d'humeur aqueuse.

Mais il nous suffit d'avoir visé cette cause d'erreur, et je reviens maintenant aux influences biologiques dont je voudrais montrer le rôle dans tous ces phénomènes.

IV

La bactériodie charbonneuse, qui vient de nous servir d'objet d'étude, ne me semblant pas, en moyenne, assez sensible pour se prêter à mes essais, je me suis adressé au bacille de la fièvre typhoïde, que l'on donne comme un des moins résistants à l'action des humeurs fraîches de l'organisme. J'avais avec lui l'avantage, en étroite relation avec le but de mes expériences, qu'il ne se conserve dans les laboratoires que dans des milieux artificiels, gélatine ou gélose, et que je pouvais en trouver de suite avec des caractères et des dispositions fixées par des milliers de générations passées en dehors de l'animal.

Dès mes premiers essais avec l'humeur aqueuse, j'ai vu la réaction hostile qu'elle exerce sur ces cultures de bacille typhique. Du bouillon peuplé de ces bacilles très agiles, étant additionné d'une gouttelette d'humeur aqueuse fraîche, le mouvement cessait aussitôt, la multiplication s'arrêtait; tous les bacilles ne périssaient pas, car on en retrouvait, 24 heures après, de capables de peupler les cultures, mais il en restait peu. Dans une expérience

de numération faite, cette fois, en ensemençant ces bacilles dans de l'humeur aqueuse pure, nous les avons vu tomber de 1,880 à 7 après quatre heures de séjour dans ce milieu.

Cette sensibilité du microbe était-elle foncière, ou pouvait-elle être modifiée chez lui comme chez les infusoires étudiés plus haut ? Pour le savoir, je n'avais qu'à appliquer les mêmes méthodes. Le bacille typhique sur lequel j'opérais était acclimaté dans les milieux artificiels, bouillon de veau ordinaire et peptonisé, par une longue série de cultures. Il n'y avait qu'à le cultiver dans ces milieux, additionnés de doses modérées et graduellement croissantes d'humeur aqueuse.

J'ai vu de suite que de faibles doses de cette humeur augmentent, au lieu de la diminuer, la valeur nutritive du bouillon pour le bacille typhique, mais que pour des doses plus fortes, par exemple pour 16 gouttelettes d'humeur ajoutées à 1^{cc} de bouillon, le développement s'arrête complètement.

Il m'a suffi de graduer assez lentement la croissance des doses pour arriver, après 11 passages, à une culture capable de se développer très activement dans de l'humeur aqueuse pure. Le 12^e passage m'a donné, pour la première fois, *un développement plus riche dans l'humeur aqueuse que dans du bouillon ordinaire non peptonisé*, et depuis lors, cette situation s'est maintenue, après quelques oscillations que nous retrouverons bientôt.

Pour me faire une idée des progrès de l'aptitude du bacille à se développer dans l'humeur aqueuse pure, je prenais à diverses époques le microbe en voie d'évolution, et je l'ensemenciais parallèlement dans de l'humeur aqueuse pure et dans du bouillon pur. On procédait aussitôt à une numération de germes faite par la méthode des boîtes de Petri, et on la recommençait à divers intervalles. Voici les nombres trouvés :

Nous avons déjà noté un chiffre de début de 1,880 bacilles ensemencés dans l'humeur aqueuse, tombant à 7 après 4 heures de contact. Voici une expérience ultérieure, du 24 avril 1890.

| | Humeur. | Bouillon. |
|-----------------------|--------------------|-----------|
| Imméd. après l'ensem. | 2,597 ¹ | 2,643 |
| 2 h. après | 2,598 | 1,184 |
| 5 h. — | 437 | infini. |
| 7 h. — | 401 | id. |

1. Tous ces nombres sont la moyenne de deux essais simultanés.

Cette fois le bacille tendait encore à disparaître de l'humeur pure, mais plus lentement qu'à l'origine. Dans le bouillon, après une période de diminution, il conservait au contraire une puissance très grande de développement.

Neuf, seize et dix-neuf jours après, voici les nombres trouvés :

| | | Humeur. | Bouillon. |
|---------|-----------------|---------|-----------|
| 4 mai. | Imm. ap. ensem. | 3,772 | 2,240 |
| | 1 h. 40 après. | 22,738 | 5,318 |
| | 3 h. » — | 94,060 | 50,147 |
| | 5 h. » — | infini | infini. |
| 10 mai. | Imm. ap. ensem. | 363 | 251 |
| | 0 h. 40 après. | 551 | 171 |
| | 2 h. » — | 841 | 324 |
| | 4 h. » — | 7,280 | 3,172 |
| | 7 h. » — | 132,316 | 305,273 |
| 13 mai. | Imm. ap. ensem. | 923 | 595 |
| | 0 h. 30 après. | 1,212 | 751 |
| | 2 h. » — | 950 | 729 |
| | 4 h. » — | 6,676 | 2,719 |
| | 6 h. » — | 55,619 | 48,667 |

On voit que le développement dans l'humeur aqueuse se rapproche de plus en plus de ce qu'il est dans le bouillon. Enfin, au moment où le bacille a été acclimaté dans l'humeur aqueuse, une dernière expérience comparative a donné :

| | Humeur. | Bouillon. |
|-----------------|---------|-----------|
| Imm. ap. ensem. | 2,547 | 1,197 |
| 1 h. après. | 2,367 | 1,268 |
| 3 h. — | 5,969 | 1,098 |
| 5 h. — | 53,595 | 3,766 |
| 7 h. — | 20,465 | 13,665 |

On voit que le développement dans l'humeur aqueuse, beaucoup plus rapide que le développement dans le bouillon, a été sept fois plus abondant que lui après 5 heures de contact. Quant aux chiffres trouvés après 7 heures, nous allons y revenir tout à l'heure.

Un fait qui se fait remarquer dans ces expériences, et qui rappelle ce que nous avons vu à propos des infusoires, est que

après chaque changement de milieu, si nutritif que soit le milieu nouveau, il y a des individus qui ne supportent pas le transport. De là ces oscillations dans le développement des microbes, si souvent observées, et qui se retrouvent d'une façon si nette dans nos expériences sur le bouillon ¹.

Ainsi le résultat de ces recherches a été d'enlever graduellement à l'humeur aqueuse et de donner au bouillon l'action bactéricide sur le bacille typhique. Mais était-ce pour ce bacille une déchéance d'acquérir cette faculté, ou bien était-ce revenir à ses conditions normales de culture dans les êtres vivants?

Pour répondre à cette question, je me suis procuré, grâce à l'obligeance de M. Vaillard, une culture de bacille typhique récemment emprunté à un malade au Val-de-Grâce, et plus près de ses origines que celui qui a fait l'objet des expériences ci-dessus. Ce bacille, porté de suite dans l'humeur aqueuse du lapin, ne m'a paru nullement souffrir de ce contact. Il n'y avait pas trace d'action bactéricide avec lui, et en le comparant avec mon bacille réacclimaté, au moyen d'une culture dans de l'humeur aqueuse fraîche de lapin, j'ai obtenu les chiffres suivants :

| | Bacille réacclimaté. | Bac. du Val-de-Grâce. |
|-------------------|----------------------|-----------------------|
| Imméd. ap. ensem. | 4,753 | 2,823 |
| 0 h. 45 après. | 2,343 | 2,123 |
| 2 h. 15 — | 6,522 | 4,015 |
| 6 h. 30 — | 450,242 | 179,218 |

J'ai à ajouter un dernier fait qui parle dans le même sens que ceux qui précèdent. Le bacille typhique acclimaté dans l'humeur aqueuse donne, si on le transporte dans de nouvelle humeur aqueuse, de courts bâtonnets analogues à ceux qu'on trouve dans l'organisme, tandis que transporté à ce même moment dans du bouillon, il s'y développe en longs filaments enchevêtrés. C'est ainsi que la bactériodie charbonneuse ne donne que des bâtonnets courts quand elle est dans son milieu naturel, et des fils très longs quand elle pousse dans du bouillon.

En somme, nous retrouvons pour nos bacilles typhiques une

1. L'ensemencement dans l'humeur aqueuse et dans le bouillon se faisait de la même manière, par un fil de platine trempé dans une culture dans l'humeur aqueuse. Une numération, faite aussitôt après, montrait une diminution immédiate du nombre des bacilles dans le bouillon, par comparaison avec ceux de l'humeur.

faculté héréditaire d'adaptation au milieu, analogue à celle que nous avons constatée pour les infusoires, et je pourrais terminer là ce mémoire, si je n'avais à revenir un instant sur quelques particularités observées dans ces études, et en particulier sur les irrégularités difficiles à expliquer, que j'ai rencontrées dans mes premiers essais de réacclimatation du bacille dans l'humeur aqueuse. Il y avait une période pendant laquelle ce bacille se montrait extrêmement sensible à la durée de son liquide qui l'avait nourri. Un bacille qui peuplait en 3 heures l'humeur aqueuse d'un œil de lapin, après ensemencement avec un fil de platine, ne pouvait pas rester une ou deux heures de plus dans ce liquide très fécond, sans devenir incapable de se développer soit dans de l'humeur fraîche, soit même dans un bouillon. On peut légitimement attribuer cette intolérance à l'action des produits de sécrétion qu'il répand autour de lui dans la culture. Quoi qu'il en soit, il est prudent dans ces études, quand on transporte le bacille dans de l'humeur aqueuse pure, de l'ensemencer simultanément dans du bouillon, et dans de l'humeur aqueuse additionnée d'une goutte de bouillon, de façon à trouver, dans cette dernière culture, une réserve en cas de dépérissement des passages dans l'humeur aqueuse pure.

Dans une autre période, le microbe a paru souffrir dans son développement par l'action d'une température au-dessus de 36-37°. A ce moment nous avons noté que c'était non le microbe, mais l'humeur aqueuse qui était modifiée à cette température : en voici la preuve. En ensemençant simultanément, par des bacilles de même provenance, deux échantillons de la même humeur aqueuse, l'une fraîchement extraite à la température de 27 à 29°, l'autre ramenée à cette température après un séjour de 7 à 8 heures à l'étuve à 38-40°, on voyait le développement se faire beaucoup plus abondamment dans l'humeur non chauffée. Plus tard la sensibilité du microbe de ce côté a disparu, et il se développe maintenant dans nos cultures avec une régularité parfaite. Les tubes à bouillon et à humeur aqueuse additionnée de bouillon sont abandonnés depuis longtemps, et la culture se fait exclusivement dans l'humeur aqueuse sans qu'il y ait à craindre le moindre danger.

REVUES ET ANALYSES

L. BRIEGER et C. FRAENKEL. Recherches sur les poisons des bactéries.
Berl. klin. Wochenschr., 1890, n° 11.

L'étude de la diphtérie est à l'ordre du jour, et chacun y contribue dans la mesure de ses forces. Le nouveau travail de M. Brieger et Fraenkel apporte, dans sa première partie, des confirmations nombreuses de ce qu'on savait déjà, et insiste avec raison sur quelques points encore mal connus, tels que les variations dans la morphologie du microbe, les variations dans sa virulence, suivant qu'il provient de tel ou tel cas de diphtérie, les différences entre ces variations de virulence originaire, et celles qu'il subit par la culture, etc. Nous laisserons de côté cette première partie du mémoire, qui est impossible à résumer sans tracer à nouveau le tableau complet de la diphtérie, pour nous attacher à la seconde partie, consacrée uniquement à l'étude du poison diphtérique.

Dans leur mémoire, MM. Roux et Yersin avaient trouvé à ce poison « beaucoup d'analogies avec les diastases; son activité, disaient-ils, est tout à fait comparable à celle de ces substances ou encore à celle des venins ¹ ». Les raisons qu'ils donnaient étaient que ce poison est détruit après 2 heures à 58°; qu'il ne supporte pas le séjour à l'air et à la lumière, comme beaucoup de diastases; que, comme les diastases, il est précipitable par l'alcool, et est entraîné par des précipités muqueux, tels que celui de phosphate de chaux, produits dans le liquide qui le contient. MM. Brieger et Fraenkel soutiennent au contraire que c'est une matière albuminoïde, dont ils font l'analyse organique et qu'ils rapprochent de l'albumine du sérum.

On pourrait dire que la question a, en somme, peu d'importance, étant de celles que nous sommes encore incapables de discuter et de résoudre. Nul de nous ne sait ce que c'est qu'une diastase, au point de vue chimique. Nous ne savons même rien sur leur état physique, et nous ne les connaissons que collées, adhérentes à d'autres substances qui les entraînent avec elles quand elles se précipitent dans les liquides qui les renfermaient; c'est ainsi que l'alcool les englobe dans le précipité de matière organique qu'il forme; c'est ainsi que le phosphate de chaux les entraîne en se déposant, mais il entraîne avec elles beaucoup

1. *Annales*, t. III, 1889, p. 287.

d'autres substances avec lesquelles les diastases restent toujours mélangées. Que dire alors de sûr à propos de substances sur lesquelles on ne sait rien, pas mêmes si elles sont azotées ?

Un certain nombre de caractères les rapprochent pourtant des matières albuminoïdes. Mais il y en a d'autres qui les en séparent, dont l'un des plus topiques est la sensibilité des diastases vis-à-vis de l'action de la lumière solaire au contact de l'air : elles s'y détruisent vite, tandis que le propre des matières albuminoïdes véritables est au contraire, d'être très résistantes vis-à-vis de cette action. La diastase est très oxydable, la matière albuminoïde ne l'est pas. En outre, quand on cherche un terme de comparaison pour un poison ou pour un venin, tel que celui de la diphtérie, qui peut agir spécifiquement et rapidement sous un poids très faible, il est plus naturel de chercher dans le monde des diastases, où on trouve à chaque pas cette spécificité et cette disproportion entre la cause et l'effet, que dans celui des matières albuminoïdes, toutes si semblables les unes aux autres, et dont la proportion peut varier notablement sans que l'organisme semble en souffrir.

Mais une discussion sur ce sujet deviendrait bientôt vétilleuse, et il n'y aurait aucun inconvénient à laisser à MM. Brieger et Fraenkel l'honneur et la responsabilité de leur affirmation, s'il n'y avait à relever dans leur mémoire deux défauts qui le déparent.

Ils isolent leur poison diphtérique en faisant arriver goutte par goutte, dans un grand volume d'alcool, du bouillon de culture du bacille de Klebs filtré au travers d'un filtre de porcelaine ; quelques gouttes d'acide acétique concentré favorisent la formation du précipité, qu'on sépare après 12 heures de séjour dans la glace, qu'on redissout dans l'eau, et qu'on reprécipite par l'alcool. En recommençant 6 à 8 fois l'opération et terminant par l'emploi de la dialyse, on finit par obtenir, par dessiccation dans le vide à 40°, une substance blanche, amorphe, grumeleuse et de densité très faible.

C'est là pour eux la toxine, qu'ils prennent la peine d'analyser. Il me paraît qu'on n'a pas le droit d'aller si vite. L'analyse organique doit être la fin de l'étude, et non pas le commencement. Il faut d'abord s'assurer que la matière sur laquelle on opère est pure, et quand elle n'est pas cristallisable ou volatile, comme c'est le cas pour le poison diphtérique, lui faire subir les épreuves réglementaires dont Chevreul nous a montré la puissance : voir, par exemple, si des quantités égales de réactif dissolvent, du commencement à la fin, des quantités égales du produit d'une même préparation, en un mot se convaincre soi-même et convaincre les autres que la matière sur laquelle on opère est une matière pure et non un mélange. MM. Brieger et Fraenkel ayant manqué à cette obligation, on aurait déjà le droit de ne

tenir jusqu'à plus ample informé aucun compte de leurs résultats.

Mais il y a plus, car il leur était facile de se convaincre eux-mêmes que leur toxine était impure. Il leur suffisait de comparer sa puissance toxique à celle de la toxine préparée par MM. Roux et Yersin. Il résulte des nombres fournis par ces savants, page 287 de leur second mémoire, qu'avec 2/10 de milligramme de leur poison, ils peuvent tuer par inoculation sous la peau un cobaye en quatre jours, et encore ont-ils soin de faire remarquer que ce poison n'est probablement pas pur, à raison de son mode de préparation. Dans les expériences de MM. Brieger et Fraenkel, on trouve que pour arriver sûrement au même résultat, il faut inoculer sous la peau du cobaye 10 milligrammes de leur toxique. Si on juge, comme on en a le droit, du degré de concentration du poison par la dose de matière active, il y avait environ cinquante fois moins du poison diphtérique dans la matière donnée et analysée comme pure par MM. Brieger et Fraenkel que dans la matière donnée comme impure par MM. Roux et Yersin. En d'autres termes, dans le produit de MM. Brieger et Fraenkel, il y avait à peine 2 0/0 de matière toxique. Le reste était, à n'en pas douter, un mélange complexe, où certaines réactions montrent de la matière albuminoïde, d'autres de la peptone, d'autres même, telles que la réaction de Millon, de la tyrosine, d'autres enfin des substances alcaloïdiques. Tout cela ruine évidemment la thèse soutenue par MM. Brieger et Fraenkel, et quand ils reprendront, comme ils le promettent, l'étude chimique de leur substance, ils auront à cœur de l'asseoir sur des bases plus solides. Si rien ne démontre que leur opinion soit vraie, rien ne démontre encore, en effet, qu'elle soit fausse, et ils sont, l'un et l'autre, gens à prendre leur revanche.

Dx.

WALTER CYGNEUS. Études sur le bacille typhique. *Beiträge zur pathol. Anat. u. z. allg. Pathol.*, VIII vol., 3 fasc., 1890.

L'objet de cette étude était la production de la fièvre typhoïde chez les animaux. Pour cela, une semence pure du bacille a été prise sur un malade typhique, et cultivée d'abord à l'aide des moyens ordinaires (cultures sur la pomme de terre, sur la gélatine).

On se servait, pour l'infection, de cultures du bacille sur la pomme de terre émulsionnées avec de l'eau stérilisée, à raison de 4 à 5 anses de fil de platine pour 10^{cc} d'eau. Les modes d'infection étaient l'injection intraveineuse, aux doses de 1 à 5^{cc}, l'introduction par la bouche (jusqu'à 20^{cc}), l'injection dans le duodénum et l'iléum, avec laparotomie (5 à 10^{cc}), et, chez les souris, l'inoculation intrapéri-

tonéale ou l'inhalation. Sur 16 lapins infectés par différents moyens, il en est mort 9; sur 11 chiens, 3; 8 souris inoculées dans le péritoine ont toutes succombé.

Les symptômes morbides observés du vivant des animaux étaient : la somnolence, le manque d'appétit, l'apathie et l'immobilité; les lapins montraient encore une élévation de température, qui commençait déjà quelques heures après l'inoculation, puis de la diarrhée et de l'amaigrissement; chez les chiens il y avait des vomissements. La mort survenait de 5 heures à 3 jours après l'infection; deux fois on l'a observée 5 et 3 semaines après l'infection par la bouche.

A l'autopsie on trouvait : rougeur et gonflement de la muqueuse de l'intestin grêle et surtout de l'iléum; gonflement des plaques de Peyer et des follicules solitaires; épanchements sanguins près de la valvule de Bauhin et des plaques de Peyer; une fois on en a observé près de l'appendice vermiforme. Deux fois on a trouvé une pigmentation brune des plaques de Peyer. Les glandes mésentériques étaient également gonflées et la rate augmentée de volume.

Les bacilles ont été retrouvés dans la rate, dans le foie, dans les intestins et dans les reins. Dans le premier de ces organes (chien, lapin) on les trouve parsemés en groupes, comme cela a été décrit par M. Fränkel et par M. Simonds. Dans le canal digestif on les trouve dans les plaques de Peyer et dans la muqueuse sous-jacente, dans les villosités et les houppes des follicules lymphatiques, puis dans la muqueuse et les conduits lymphatiques de la membrane séreuse et musculaire, aussi bien qu'entre les deux couches de muscles circulaires et longitudinaux; enfin, dans les capillaires des membranes muqueuses de l'intestin. Dans le foie (lapin) on a trouvé des groupes de bacilles dans les formations lymphatiques et dans les capillaires; dans ces derniers ils produisaient des gonflements variqueux, ce qui permet de conclure qu'ils s'y sont multipliés sur place. Dans les reins (lapin) les bacilles ont été trouvés dans les glomérules, mais pas dans les conduits urinaires. Dans les glandes mésentériques les vaisseaux en contenaient une certaine quantité disposés en groupes. Enfin, on a pu les retrouver encore dans la moelle des os.

L'examen à l'aide de cultures a démontré la pleine vitalité de ces bacilles. Dans un chien infecté par le duodénum après laparotomie, et que l'on a tué 14 jours après, les bacilles trouvés dans la rate se sont montrés encore vivants. Enfin, on a pu isoler des bacilles typhiques dans les défécations d'un lapin auquel on en avait injecté dans la veine de l'oreille, comme cela a été fait par MM. Chantemesse et Vidal.

W.-M. H.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE ¹ DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — MAI 1890.

| | A | | B | | C | |
|--|----|----|----|----|----|----|
| Morsures à la tête { simples..... | » | » | » | 2 | » | 2 |
| et à la figure { multiples.... | » | 1 | » | 5 | » | » |
| Cautérisations efficaces..... | » | » | » | » | » | » |
| — inefficaces..... | » | » | » | 2 | » | » |
| Pas de cautérisation..... | 1 | » | » | 5 | » | » |
| Morsures aux mains { simples..... | » | 10 | » | 21 | » | 5 |
| multiples.... | » | 8 | » | 25 | » | 5 |
| Cautérisations efficaces..... | » | » | » | 3 | » | » |
| — inefficaces..... | 9 | » | » | 25 | » | 5 |
| Pas de cautérisation..... | 9 | » | » | 18 | » | 5 |
| Morsures aux mem- { simples..... | » | 8 | » | 21 | » | 2 |
| bres et au tronc { multiples.... | » | 9 | » | 14 | » | 4 |
| Cautérisations efficaces..... | 3 | » | » | 3 | » | » |
| — inefficaces..... | 8 | » | » | 18 | » | 5 |
| Pas de cautérisation..... | 6 | » | » | 14 | » | 4 |
| Habits déchirés..... | 15 | » | » | 30 | » | 6 |
| Morsures à nu..... | 2 | » | » | 5 | » | » |
| Morsures multiples en divers points du corps..... | » | 1 | » | 3 | » | » |
| Cautérisations efficaces..... | » | » | » | » | » | » |
| — inefficaces..... | 1 | » | » | 2 | » | » |
| Pas de cautérisation..... | » | » | » | 1 | » | » |
| Habits déchirés..... | 1 | » | » | 2 | » | » |
| Morsures à nu..... | 1 | » | » | 3 | » | » |
| Totaux. { Français et Algériens .. | 36 | 37 | 65 | 91 | 17 | 18 |
| { Etrangers .. | 1 | .. | 26 | .. | 1 | .. |
| | A | | B | | C | |
| TOTAL GÉNÉRAL..... 146 | | | | | | |

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 137 fois; chats, 8 fois. Dans un cas, la morsure a été faite par un homme atteint de rage.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.